

**Einfluss von Serum auf die Freisetzung von  
Interleukinen nach Infektion von Fibroblasten  
und Epithelzellen mit parodontopathogenen  
Keimen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae dentariae  
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Marcus Rönnebeck  
geboren am 25.11.1975 in Stuttgart

Erster Gutachter:.....

Zweiter Gutachter:.....

Dritter Gutachter:.....

Tag der öffentlichen Verteidigung:.....

## Abkürzungsverzeichnis

A.a / A. actinomycetemcomitans	Actinobacillus actinomycetemcomitans
AP	Apoptosis Protein
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine Serum Albumin
CAL	Clinical Attachment Loss
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
EMEM	Eagle Minimum Essential Medium
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FCS	Fetal Calf Serum
GHSA	Glycated Human Serum Albumin
G-Protein	Guanin-Nucleotid-Bindendes Protein
GRO	Groth-Related Aktivität
HGF	Human Gingival Fibroblast
HSA	Humanes Serumalbumin
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IL	Interleukin
KBE	Koloniebildende Einheit
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mitogen-Activated Protein
MMP	Matrix-Metall-Proteinase
MOI	Multiplicities of infection
MRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NF	Nuclear Factor
Omp	Outer membrane protein
P.g. / P.gingivalis	Porphyromonas gingivalis
PAR	Protease-Activated Receptors
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGE	Prostaglandin E <sub>2</sub>

PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PTEC	Proximal Tubular Epithelial Cells
RA	Rezeptorantagonist
RPEC	Retinal Pigment Epithelium Cells
TBS	Tris Buffered Saline
TLR	Toll-Like-Receptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Liquid Substrate System
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Parodontale Erkrankungen mit ihrer Nomenklatur	3
2.2	Pathogenese der Parodontitis	5
2.3	Wichtige proinflammatorische Zytokine und ihre Bedeutung in der Parodontitis	10
2.4	Parodontopathogene Keime mit besonderer Betrachtung von A. actinomycetemcomitans und P. gingivalis	14
<b>3</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>19</b>
4.1	Die Zellpassage	19
4.2	Verwendete Medien und Zusätze	20
4.3	Versuchsdurchführung	20
4.4	Interleukinnachweis	24
4.4.1	Verwendete Lösungen und Zusätze	25
4.4.2	Durchführung des Interleukinnachweises	25
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
5.1	Einfluss von Serum und Albumin auf P. gingivalis 33277 und A. actinomycetemcomitans Y4 bei KB-Zellen	28
5.2	Einfluß von Serum und Albumin auf P. gingivalis 33277 und A. actinomycetemcomitans Y4 im Zusammenhang mit gingivalen Fibroblasten	37
5.3	Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei KB-Zellen	40
5.3.1	Einfluss von Serum auf die Ausschüttung von IL-6 zu verschiedenen Infektionszeitpunkten	40
5.3.2	Einfluss von Serum auf die Ausschüttung von IL-8 zu verschiedenen Infektionszeitpunkten	43
5.3.3	Einfluss von Patientenserum auf die Ausschüttung von IL-6 und IL-8	44
5.4	Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei Fibroblasten	46

5.4.1	Einfluss von Serum auf die IL-6-Ausschüttung zu verschiedenen Infektionszeitpunkten . . . . .	46
5.4.2	Einfluss von Serum auf die IL-8-Ausschüttung zu verschiedenen Infektionszeitpunkten . . . . .	47
5.4.3	Einfluss von Patientenserum auf die Ausschüttung von IL-6 und IL-8 . . . . .	49
5.4.4	Einfluss von HSA auf die Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei KB-Zellen und Fibroblasten . . . . .	50
<b>6</b>	<b>Diskussion . . . . .</b>	<b>53</b>
6.1	Methodik . . . . .	53
6.2	Adhäsion und Invasion von <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 und <i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4 bei KB-Zellen . . . . .	55
6.3	Interleukinfreisetzung . . . . .	60
6.3.1	Interleukinfreisetzung bei KB-Zellen nach Infektion mit <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 und <i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4 . . . . .	60
6.3.2	Interleukinfreisetzung und freie Bakterien bei Gingivafibroblasten nach Infektion mit <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 und <i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4 . . . . .	63
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerung . . . . .</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis . . . . .</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>Anhang . . . . .</b>	<b>80</b>
<b>A</b>	<b>Danksagung</b>	
<b>B</b>	<b>Lebenslauf</b>	
<b>C</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	



# 1 Zusammenfassung

*P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* gehören zu den wichtigsten Bakterienspezies bei parodontalen Erkrankungen. Ihre Fähigkeit, an Zellen zu haften bzw. in sie einzudringen, stellt eine wichtige Schlüsselfunktion für den Verlauf der Infektion dar. Der erste immunologische Kontakt mit den Erregern findet bei der Parodontitis im Sulkus statt. Durch oberflächliche Gefäße wird der Sulkus mit einer Flüssigkeit versorgt, die in der Zusammensetzung der des Blutserums gleicht. Neben Antikörpern, Komplementfaktoren und Abwehrzellen sind ebenfalls Bluteiweiße wie Albumin in der Sulkusflüssigkeit enthalten, deren Funktion bei proinflammatorischen Vorgängen noch weitgehend ungeklärt ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss des Serums auf die Zahl der Bakterien, auf die Freisetzung von IL-6 und IL-8 zu untersuchen. KB-Zellen und Fibroblasten wurden mit *P. gingivalis* oder *A. actinomycetemcomitans* infiziert. Dabei wurden drei Versuchsabläufe gewählt. Es wurden einerseits vor der Infektion Bakterien oder Zellen mit Serum vorinkubiert oder gleichzeitig mit Serumzugabe infiziert. In einer weiteren Versuchsreihe erfolgte die Infektion synchron mit Patientenserum oder Albumin. Neben den Kontrollen ohne Serum variierten die Serumkonzentrationen von 2,5 %, 5 % und 10 %. bzw. 25 mg/ml, 50 mg/ml und 100 mg/ml Albumin. Nach einer Versuchsdauer von 1 Stunde, 6 und 18 Stunden wurden die Zahlen der freien, adhärennten und internalisierten Keime festgestellt und die freigesetzten Mengen IL-6 und IL-8 gemessen.

In diesen Versuchen zeigte sich, dass *A. actinomycetemcomitans* weitgehend unempfindlich gegenüber unterschiedlichen Serumkonzentrationen war. Bei *P. gingivalis* konnte bei Vorinkubation der Zellen eine serumabhängige Verringerung der Adhärenz beobachtet werden. Wurden die Bakterien zuerst dem Serum ausgesetzt, war eine Steigerung der Adhärenz zu beobachten. Beide Bakterienspezies zeigten unter Einfluss von humanem Serumalbumin eine konzentrationsabhängige Verminderung der Adhärenz wie auch der Invasion.



Beide Bakterienstämme waren in der Lage, IL-6 und IL-8 bei den Zellen freizusetzen. In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass neben dem bakteriellen Stimulus auch Serum eine proinflammatorische Wirkung hat. Dies zeigte sich besonders deutlich bei den KB-Zellen. Wurde Serum zum Zeitpunkt der Infektion zugegeben, stieg nach 6 Stunden die IL-6-Ausschüttung bei 2,5 % um das 40,3fache an. Im selben Zeitraum wurde bei einem Zusatz von 10 % Serum das 5,16fache an IL-8 freigesetzt. Fibroblasten reagierten nicht so deutlich. Bei gleichzeitiger Infektion und 2,5%igem Serumzusatz wurde 2,2mal mehr IL-6 ausgeschüttet. Ebenfalls nach 18 Stunden stieg die IL-8-Freisetzung um das 6,8fache an.

Als wirksamer Bestandteil des Serums bei den geförderten IL-6-Freisetzungen konnte das humane Serumalbumin nachgewiesen werden. Konzentrationsabhängig stieg bei KB-Zellen und Fibroblasten die IL-6-Ausschüttung an. Albuminzusatz bewirkte jedoch bei beiden Zellen nur eine geringfügige Änderung der freigesetzten IL-8-Menge.

Serumalbumin besitzt möglicherweise eine protektive Wirkung, da es infektiöse Keime daran hindert, sich an Zellen anzulagern und in sie einzudringen. Zusätzlich kann durch die gesteigerte Menge an IL-8 bei KB-Zellen die chemotaktische Anlockung von Abwehrzellen gefolgert werden. Allerdings steht auf der anderen Seite eine mögliche Knochenresorption durch die verstärkte Ausschüttung von IL-6 bei beiden Zellen durch HSA.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Parodontale Erkrankungen mit ihrer Nomenklatur**

Ausgehend von dem Erkenntniszuwachs zur Ätiologie, Pathogenese und Epidemiologie der parodontalen Erkrankungen und der daraus resultierenden Notwendigkeit einer Überarbeitung der Klassifikation dieser Erkrankungen wurde 1997 von der American Academy of Periodontology (AAP) ein Komitee, dem auch Wissenschaftler aus Europa inklusive Deutschland angehörten, zur Planung und Organisation eines internationalen Workshop für die Erarbeitung einer aktuellen Klassifizierung ins Leben gerufen. 1999 erfolgte auf dem International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions in Oak Brook (Illinois/USA) die Erarbeitung dieser neuen Klassifizierung der Parodontalerkrankungen. Es wurde vorgeschlagen, dass die Klassifizierung der Parodontitis nicht mehr nach der Altersabhängigkeit, sondern auf der Grundlage klinischer und radiologischer Merkmale erfolgen sollte (Armitage 1999).

Die zwei häufigsten Formen der parodontalen Destruktion umfassen folgende zwei Krankheitsbilder: die durch Plaque induzierte Gingivitis und die Parodontitis. Die Gingivitis ist eine entzündliche Reaktion des Weichgewebes, welches dem Zahn anliegt. Die Entzündung der marginalen Gingiva lässt sich anhand der klinischen Merkmale wie Rötung, Schwellung, Blutung, erhöhte Sulkusflüssigkeitsfließrate bestimmen und durch bestehendes Attachment von der Parodontitis abgrenzen. Die Entzündungsreaktion stellt eine direkte Immunantwort des Organismus auf den angesiedelten Biofilm dar (Kinane 2001). Mit Verlust des bindegewebigen Attachments bei einer bestehenden Entzündung lässt sich die Parodontitis von der Gingivitis unterscheiden (Listgarten 1986). Eine Parodontitis kann einer Gingivitis folgen und hat die Zerstörung des parodontalen Ligaments, des Alveolarknochens und des Weichgewebes zur Folge (Hellwig et al. 1999). Trotz der großen histopathologischen Gemeinsamkeiten fehlt der Beweis, dass eine Gingivitis als unausweichbare Folge immer eine Parodontitis nach sich zieht (Brown und Loe 1993).

## **Chronische Parodontitis**

Bei der chronischen Parodontitis liegt der Altersgipfel über 35 Jahren, wobei mehr Männer als Frauen erkranken (Albandar et al. 1999). Es kommt zu einem Attachmentverlust von  $\geq 4$  mm, einhergehend mit unterschiedlich starken Entzündungsprozessen der Gingiva (Schröder 1991). Klinisch lässt sich in den meisten Fällen subgingivaler Zahnstein nachweisen. Im Röntgenbild zeigt sich ein horizontaler Knochenabbau (Karpinia und Magnusson 2000, Fowler et al. 2001). Die chronische Parodontitis geht mit einer langsamen Destruktion der beteiligten Gewebe einher. Je ausgeprägter die parodontale Destruktion ist, desto häufiger dominieren anaerobe Bakterien, vor allem Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia und Tannerella forsythia, die parodontale Läsion (Genco 1996a).

Die chronische Parodontitis kann nach Ausmaß und Schwere folgendermaßen unterteilt werden:

### **Ausmaß:**

- |                         |                                 |
|-------------------------|---------------------------------|
| 1) <b>Lokalisiert</b>   | < 30 % der Zahnflächen befallen |
| 2) <b>Generalisiert</b> | > 30 % der Zahnflächen befallen |

### **Schweregrad:**

- |                          |                  |
|--------------------------|------------------|
| 1) <b>leichte Form:</b>  | 1 bis 2 mm (CAL) |
| 2) <b>moderate Form:</b> | 3 bis 4 mm (CAL) |
| 3) <b>schwere Form:</b>  | > 5 mm (CAL)     |

## **Aggressive Parodontitis**

Die aggressive Parodontitis ist als infektiöse, entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates mit rasch fortschreitender Gewebsdestruktion definiert. Ihr Charakteristikum ist der schnelle Attachmentverlust bzw. rascher Abbau des Alveolarknochens. Beschreibend für die aggressive Parodontitis ist die Schwere der parodontalen Destruktion, die mit vertikalen, speziell auch intraalveolären, Knochendefekten einhergeht, und oft nicht mit der vorhandenen Plaquemenge in Relation steht. Die klassischen Entzündungszeichen der Gingiva können

manchmal auch fast vollständig fehlen. Häufig wird ein erhöhter Serumantikörpertiter auf bestimmte parodontopathogene Bakterien, wie z.B. *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis*, nachgewiesen (Listgarten et al. 1981, Page et al. 1983, Martin et al. 1986, Flemming 1993).

Für die beiden Befallsformen – lokalisierte und generalisierte, aggressive Parodontitis gelten folgende pathognomische Unterscheidungen:

Bei der lokalisierten Variante ist ein Auftreten meist in der Pubertät mit dem Befall der ersten Molaren und Inzisiven zu beobachten. Ein markanter Serumantikörpertiter gegen nachgewiesene Keime ist feststellbar. Bei der generalisierten Form der Parodontitis sind die Patienten meist jünger als 30 Jahre mit einem Attachmentverlust an mindestens 3 Zähnen neben den ersten Molaren und den Inzisiven. Der Verlauf ist deutlich episodenhafter und es ist nur ein schwacher Serumantikörpertiter nachweisbar (Armitage 1999).

## **2.2 Pathogenese der Parodontitis**

Parodontale Erkrankungen haben ihren Ursprung in einem multifaktoriellen Geschehen. Der Ausdruck Risikofaktoren trägt der Tatsache Rechnung, dass die individuelle Lebensführung, die Exposition zur Umwelt und persönliche Umstände mit der gesundheitlichen Verfassung in Verbindung stehen (Last 1988). Obwohl die Anwesenheit bestimmter Mikroben als unerlässlich angesehen wird, reicht das alleinige Vorhandensein noch nicht aus, um einen pathogenen Prozess einzuleiten (Socransky und Haffajee 1992). Vielmehr sind parodontopathogene Prozesse eine Konsequenz aus der Wechselwirkung von Genetik, Umwelt, Wirtsabwehr und mikrobiellem Befall (Wolff et al. 1994).

Obwohl schon mehr als 300 verschiedene Bakterienarten aus parodontalen Taschen isoliert wurden, ist es mehr als wahrscheinlich, dass nur ein geringer Anteil ätiologisch relevant sein dürfte (Zambon 1996). Carlos und seine Kollegen stellten 1988 fest, dass die Anwesenheit von *P. intermedia* mit

gingivalem Bluten und harten Belägen mit dem Attachmentverlust im Zusammenhang steht.

Für einen beschleunigten Verlauf der parodontalen Zerstörung ist weiterhin die Zunahme der Plaquemasse mit einer veränderten Zusammensetzung verantwortlich. Die steigende Anzahl an Keimen wie *Actinomyces* und *Treponoma*-Arten und gramnegativen Keimen wie *Fusobacterium nucleatum* und *Veillonella parvula* sind einerseits zu nennen, andererseits auch der Wechsel der Population hin zu einer überwiegend anaeroben Zusammensetzung (Carlos et al.1988).

In vielen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen stetigem Tabakkonsum und Attachmentverlust nachgewiesen (Haber 1994, Preber und Bergström 1990). Raucher mit parodontalen Erkrankungen weisen weniger klinische Entzündungszeichen als Nichtraucher auf (Feldmann et al. 1983). Dies kann durch das Verbrennungsprodukt Nikotin erklärt werden. Nikotin wirkt als Vasokonstringenz und kann somit die klinischen Merkmale wie Blutung und Schwellung reduzieren.

Fibroblasten können unterschiedliche Proteinase ausbilden, die zur Familie der Matrix-Metall-Proteinase (MMP) oder zu den Serin-, Cystein- und Aspartatsäure- Proteinase gehören. Als Matrix-Metall-Proteinase werden hauptsächlich MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13 und MMP-14 gebildet. Sie haben in ihrem katalytischen Zentrum ein  $Zn^{2+}$ -Ion und werden intrazellulär in inaktiven Vorstufen gespeichert. Die Familie der MMP kann zusammen jegliche Art extrazellulärer Matrix einschließlich Knochen abbauen (Stocker et al. 1995). Die Fibroblasten MMP-1 können in der Sulkusflüssigkeit von Patienten nachgewiesen werden, die an der juvenilen Form der Parodontitis (heute aggressive Parodontitis) erkrankt sind. Hingegen lässt sich in eher chronischen Erkrankungen die MMP-8 in der Sulkusflüssigkeit nachweisen (Ingman et al. 1994). MMP-8, die normalerweise durch PMN freigesetzt wird, kann auch durch Fibroblasten sezerniert werden, die mittels IL-1 aktiviert wurden (Abe et al. 2001).

Systemische Erkrankungen können sich negativ auf das Immunsystem auswirken und somit auch zum Risikofaktor werden wie, z.B. Down-Syndrom, Papillon-Lefèvre-Syndrom oder Chediak-Higashi-Syndrom. Neutrophile Granulozyten, die in ihrer Anzahl oder in ihrer Funktion eingeschränkt sind, werden mit schweren Formen der parodontalen Destruktion in Verbindung gebracht (Genco und Loe 1993). Ebenso scheinen Patienten mit Diabetes mellitus eine erhöhte Prävalenz und einen ausgeprägteren Schweregrad der Destruktion zu haben als der Rest der Bevölkerung (Katz 1991, Oliver und Tervonen 1993). Andere genetische Einflüsse können sich in einer eingeschränkten Phagozytenfunktion oder in einer reduzierten Fähigkeit, bestimmte Immunglobuline herzustellen, widerspiegeln. Weiterhin können verschiedene Polymorphismen bei unterschiedlichen Cyclooxygenase-1-Genen, Fc-Rezeptor-Genen, TNF- $\alpha$ -Genen und IL-1-Genen als Risikofaktoren ausgemacht werden (Page 1999).

### **Sulkusflüssigkeit**

Der zentrale Ort für immunologische Vorgänge hinsichtlich parodontaler Erkrankungen ist das Sulkusepithel bzw. der parodontale Spalt. Das Epithel selbst ist für Stoffe mit niedrigem Molekulargewicht durchlässig und der Fluß von Gewebsflüssigkeit in den Sulkus scheint eine wichtige Rolle der Abwehr und der lokalen Homöostase zu sein (Krasse 1996). Der Ursprung der Sulkusflüssigkeit liegt in den Blutgefäßen des gingivalen Kapillarbetts im Corium (Alfano 1974). Die Bestandteile haben ihren Ursprung einerseits im Serum und im Interstitium, andererseits stammen sie aus der subgingivalen Plaque. Die Bestandteile korrelieren mit der Molekülgröße, die durch ein intaktes Epithel passiv gefiltert werden. Es beinhaltet somit Elektrolyte, Fibrinogen und Albumin, Lipoproteine, spezifische Antikörper (IgG, IgA und Mikroglobulin  $\beta_2$ ), Zytokine, bakterielle Antigene und Enzyme. Die Konzentrationsverhältnisse der Serumbestandteile der Sulkusflüssigkeit scheinen denen im Blutserum bei gesunder Gingiva zu ähneln (Lamster 1997, Ebersole 2003, Lamster und Novak 1992 und Nomura et al. 1998). Auf zellulärer Seite sind abgeschilferte Epithelzellen zu finden, die passiv ausgewaschen wurden, Leukozyten (PMN, Monozyten/Makrophagen und

Lymphozyten), Erythrozyten und Bakterienzellen aus der Plaque (Engelberg 1963, Mukherjee 1985, Skapski und Lehner 1976).

Bei bestehender Entzündung ändern sich die Konzentrationverhältnisse des Transsudats. Der Anteil an Entzündungszellen, Serumbestandteilen, und Entzündungskomponenten aus dem umliegenden Gewebe steigt an (Ebersole 2003). Neutrophile Granulozyten dominieren deutlich, unabhängig vom Grad der Destruktion, mit einem Anteil von ca. 95 %. Weiterhin werden aber auch 2-3 % Monozyten und 1-2 % Lymphozyten (Wilton et al. 1976) gefunden, wobei es aber zu großen Schwankungen innerhalb der Zusammensetzung kommen kann.

Im Zusammenhang mit einer Parodontitis können in der Sulkusflüssigkeit Zytokine wie Prostaglandine, Leukotrine oder auch Interleukine nachgewiesen werden. Speziell Interleukine haben eine wichtige Funktion, da sie sich regulierend in Abwehrprozesse einfügen. Am häufigsten werden IL-1, IL-6, IL-8 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  gefunden (Okada und Murakami 1998).

### **Immunantwort**

Bei beginnender bakterieller Reizung des parodontalen Gewebes wandern neutrophile Granulozyten chemotaktisch geführt aktiv aus dem Gewebe in den Sulkus. Ihre Konzentration kann dort stark über das Niveau des peripheren Blutes zunehmen. Als erster Abwehrmechanismus des Organismus formieren sie sich entlang der Plaque zu einer Barriere zwischen den eindringenden Bakterien und der Gewebeoberfläche. An dieser Stelle soll weiteres Vordringen der Keime oder ihrer Stoffwechselprodukte verhindert werden, indem pathogene Bakterien einerseits phagozytiert oder durch Degranulation unschädlich gemacht werden (Miyasaki 1991, Schröder 1970, Scully 1982). Bei der Phagozytose assistiert das spezifische Immunsystem den PMN. Opsonierte Antigene werden durch das Komplementsystem oder bei Antikörpern über den Fc-Rezeptor erkannt, umschlossen und in einem Phagosom verdaut (Wilson et al. 1995). Einen wohl noch wirkungsvolleren Mechanismus der Plaquekontrolle stellt die Degranulation der Zellen mit der extrazellulären Vernichtung der

Mikroben dar. Die Granula enthalten antimikrobielle Substanzen und Enzyme, die aber auch das eigene Gewebe angreifen. Vor allem die Kollagenase Elastase und Gelatinase sind drei potente Enzyme, die parodontales Gewebe angreifen und zerstören (Smith 1994).

Weitere Zellen der Sulkusflüssigkeit sind Monozyten und Gewebsmakrophagen, T- und B-Lymphozyten und Plasmazellen. Unter den Lymphozyten wurde in der Sulkusflüssigkeit eine Dominanz der B-Lymphozyten gegenüber den T-Lymphozyten nachgewiesen. Das Mengenverhältnis von T-Lymphozyten zu B-Lymphozyten wurde auf 1:2,7 festgestellt. (Wilton et al. 1976). Die B-Lymphozyten produzieren spezifische Antikörper, welche Antigene opsonieren oder über Immunkomplexe die Kaskade des Komplementsystems in Gang setzen. Das Komplementsystem besteht aus mehreren, unterschiedlichen im Blut vorkommenden Proteinen, die ebenfalls Antigene opsonieren und somit der Phagozytose zuführen bzw. durch Perforation eigenständig Zellen abtöten können (Wilson und Genco 1989).

Gegen bakterielle Toxine können auch Antikörper von B-Zellen produziert werden, die diese Toxine unschädlich machen (Andrew et al. 2003).

Als eine weitere wichtige Abwehrzellart sind die T-Lymphozyten zu nennen. Aufgrund ihrer Oberflächenmerkmale lassen sich vor allem zwei verschiedene Typen unterscheiden. Ein Typ spezialisiert sich auf die Abtötung von Zellen und wird T-Killerzelle genannt. Die andere Klasse ist ganz auf Kooperation mit anderen Abwehrmechanismen ausgerichtet und wird als T-Helferzelle bezeichnet (Golenhofen 2000).



## **2.3 Wichtige proinflammatorische Zytokine und ihre Bedeutung in der Parodontitis**

Es ist schon seit längerem bekannt, dass Zellen sich zur Kommunikation untereinander kleiner wasserlöslicher Boten, der Zytokine, bedienen. Einige haben dabei durchaus Ähnlichkeiten mit Hormonen, wobei diese eher in zusammenhängenden Drüsen als in einzelnen Zellen produziert werden, wie es bei den Zytokinen der Fall ist. Zytokine sind eine sehr heterogene Gruppe von zum Teil ganz unterschiedlichen Stoffen, die nur folgende Charakteristika gemeinsam haben. Sie werden nur in geringen Mengen sezerniert, wobei sie aber höchst wirksam und in Konzentrationen von nur  $10^{-15}$  bis  $10^{-10}$  M schon aktiv sind. Weiterhin werden sie nicht von unstimulierten Zellen produziert. Die meisten Zytokine wirken über Rezeptoren und verstärken die Immunantwort (Klein 1991).

Verschiedene Stimuli, wie sie auch bakterielle Stoffwechselprodukte hervorrufen können, erzeugen eine Zytokinfreisetzung, welche sich vielfältig in der Zielzelle äußert. Sie sind auch für die Produktion anderer Zytokine verantwortlich und können so möglicherweise bei der Expression verschiedener Proteine eingreifen. Als Endergebnis resultiert ein komplexes, feinreguliertes Netzwerk, welches die Vernichtung der eingedrungenen Keime zum Ziel hat (Curfs et al. 1997).

Bei den entzündlichen Vorgängen im Parodont werden bei der Immunantwort im Interleukinprofil am häufigsten IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 gefunden (Kesavalu et al. 2002), deren Auswirkungen vielfältig sind und nachfolgend genauer beschrieben werden.

### **Interleukin-1 (IL-1)**

Zur Interleukin-1-Familie gehören zwei unterschiedliche Moleküle, die sich in ihren Effekten stark ähneln, also agonistisch zueinander verhalten. Dabei handelt es sich um IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  mit einem Molekulargewicht von jeweils 17,5 kDa. Beide werden von eng aneinander liegenden Loci auf Chromosom 2

transkribiert, wobei IL-1 $\alpha$  überwiegend membrangebunden wirkt und IL-1 $\beta$  überwiegend sezerniert wird. Ebenfalls gehört zur IL-1-Familie ein Polypeptid, welches IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra) genannt wird (Dinarello 1994). Die Polypeptide der IL-1-Familie entfalten ihre Wirkung indem, sie auf zwei unterschiedliche Rezeptoren (IL-1RI und IL-1RII) als Liganden wirken. Hierbei ist IL-1RI-Rezeptor der eigentliche Initiator für eine Signaltransduktion für IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  bindet zwar auch an den IL-1RII Rezeptor, wobei es aber zu keiner Signalumsetzung kommt. IL-1ra wirkt bei der Signaltransduktion als kompetitiver Hemmstoff (Colotta et al. 1993, Sims et al. 1994).

IL-1 wird von sehr vielen unterschiedlichen Zelltypen produziert. Bei parodontalen Erkrankungen spielen vor allem Monozyten/Makrophagen, PMN, Fibroblasten (Gingiva und Ligament), Epithelzellen, Endothelzellen und Osteoklasten eine übergeordnete Rolle. Durch den IL-1-Stimulus werden verschiedene Abläufe initiiert, die eine Entzündung (Produktion von PGE<sub>2</sub> oder Chemokinen), Knochenabbau durch die Aktivierung von Osteoklasten und den Zusammenbruch von Weichgewebe durch verschiedene Proteinasen, wie z.B. Matrix-Metall-Proteinasen, fördern. Durch IL-1 werden Endothelzellen zur verstärkten Synthese von Adhäsinen angeregt. Sie sind notwendig für Leukozyten, damit sie das Gefäßbett verlassen und das darunterliegende Gewebe infiltrieren können. (Dinarello 1996, Feghali und Wright 1997).

Beim Knochenverlust scheint IL-1 eine entscheidende Funktion zu haben. Aktivierte Monozyten und PMN sezernieren IL-1 und andere Entzündungsmediatoren, welche osteoklastische Aktivitäten fördern. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass bei Gabe von IL-1- bzw. TNF- $\alpha$ -Rezeptorblockern der Verlust des bindegewebigen Attachments bis zu 50 % reduziert werden konnte (Delima et al. 2001, Jacobs et al. 2001, Jiang et al. 2002).

Proinflammatorische Zytokine der IL-1-Familie nehmen einen zentralen Platz in der primären Entzündungsreaktion ein. Je mehr Interleukin-1 produziert und sezerniert wird, desto schneller und tiefgreifender geht die Destruktion

vonstatten. Hierbei scheinen auch andere Interleukine wie IL-10 und IL-11 eine wichtige Rolle zu spielen, die normalerweise die Expression von IL-1 hemmen (Seymour und Gemmell 2001).

### **Interleukin-6 (IL-6)**

IL-6 hat ein Molekulargewicht von 22 bis 29 kDa, der Transkriptionsort liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 7. Als Rezeptor dienen zwei Proteine (gp80 und gp130). Das Protein gp80 wird als löslicher Rezeptor (sIL-6r) aus Zellen freigesetzt und kann sich an das IL-6-Molekül binden. Die Signalübertragung wird durch das Membrangebundene Protein gp130 vollzogen, welches den sIL-6r-IL-6-Komplex binden kann (Curfs et al. 1997).

IL-6 wird von vielen verschiedenen Zellen, unter anderem Fibroblasten, Epithelzellen, PMN, Makrophagen, B- und T-Zellen, synthetisiert. IL-6 wird von intakten, gesunden Zellen nicht spontan sezerniert, sondern erst nach einem stimulierenden Reiz wie, z.B. bakteriellem LPS, IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  (Kishimoto 1989). Dabei unterliegt die Freisetzung von IL-6 weiteren Kontrollinstanzen. Takigawa und seine Kollegen konnten 1994 zeigen, dass durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  stimulierte Fibroblasten weniger IL-6 freigesetzt wird wenn zugleich Prostaglandin E<sub>2</sub> vorhanden war (Tagikawa et al. 1994).

IL-6 ist ein sehr vielseitiges Zytokin mit vielen biologischen Funktionen. Zu den wichtigsten gehören die Stimulation der unspezifischen B-Zellproduktion, die Sekretion von Antikörpern durch B-Lymphozyten, die Proliferation von T-Lymphozyten und die Aktivierung von Hepatozyten zur Produktion von Akut-Phase-Proteinen. Zusammen mit IL-1 und TNF- $\alpha$  induziert IL-6 die Produktion von C3, Faktor B, Haptoglobin und weiteren Proteinen. IL-6 senkt in Hepatozyten die Produktion von Albumin.

Zusammen mit anderen Interleukinen wie IL-1 $\beta$ , IL-11, IL-17 und TNF- $\alpha$  konnte auch bei IL-6 die knochenresorbierende Wirkung nachgewiesen werden. Sie lässt sich auf die gesteigerte Differenzierung der Osteoklasten bzw. deren gesteigerte Aktivität zurückführen (Heymann et al. 1998).

IL-6 kann in erhöhtem Maße, wie auch die mRNA von IL-6, bei Patienten mit chronischer Parodontitis in der Sulkusflüssigkeit oder im Parodont nachgewiesen werden (Okada et al. 1997, Wong und Clark 1988).

### **Interleukin-8 (IL-8)**

IL-8 gehört einer Untergruppe von Interleukinen, den sog. Cystein-X-Cystein-Chemokinen, an. Es wird auf dem langen Arm des 4. Chromosoms transkribiert und hat ein Molekulargewicht von 8 kDa. Zwei Rezeptoren (CXCR-1 und CXCR-2), die mit einem membranständigen G-Protein gekoppelt sind, übertragen das Signal ins Innere der Zielzelle. Das Rezeptorprotein CXCR-1 ist hochspezifisch auf IL-8 ausgelegt, während dessen CXCR-2 noch weitere Liganden wie GRO zulässt. IL-8 wird relativ früh bei einer beginnenden Infektion von Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, Fibroblasten, Endo- und Epithzellen Keratinozyten und weiteren Zellen produziert (Curfs et al. 1997).

Zu den auslösenden Stimuli gehören IL-1 und TNF- $\alpha$ . Auch LPS regt die Produktion von IL-8 bei Fibroblasten, Gingivaepithelzellen und Monozyten an (Sfakianakis et al. 2001). Aktivierte Gingivaepithelzellen produzieren neben IL-8 auch das Interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1). Dabei bildet sich ein Gradient mit der höchsten Konzentration von ICAM-1 und IL-8 an der dem Zahn zugewandten Epithelseite aus. Dieser Gradient ist ausschlaggebend für die Aktivierung und Migration der Leukozyten (Huang und Zhang 1999, Tonetti et al. 1998). Die Aktivierung von Leukozyten beinhaltet ihre Adhäsion an den Epithelzellen und die Exozytose von primären und sekundären Granula, welche eine Reihe von verschiedenen lysierenden Enzymen enthalten. Im Rahmen parodontaler Entzündungen wird in hohem Ausmaß das Enzym Elastase von PMN ausgeschüttet und in der Sulkusflüssigkeit nachgewiesen. Elastase ist eine hochpotente Serinprotease, welche Fibronektin und Kollagen Typ IV als Substrat verwertet. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion von IL-8 mit der Reduktion der Elastase positiv korreliert (Owen und Campbell 1999, Jin et al. 2002).

## **2.4 Parodontopathogene Keime mit besonderer Berücksichtigung von *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis***

In subgingivaler Plaque können inzwischen über 300 verschiedene Keime nachgewiesen werden. Wahrscheinlich spielen davon aber nur rund 10-20 eine Rolle im Rahmen der parodontalen Pathogenese (Socransky und Haffajee 1994). In dem Konsensusreport von 1996 wurden bedeutende Keime, die für die Entstehung von Parodontopathien eine große Rolle spielen, aufgeführt. Dabei handelt es sich um *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* und weitere Keime, wie unter anderem *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* und *Treponema denticola* (Genco et al. 1996b und Socransky 1977). definierte fünf Merkmale, die parodontopathogene Keime beschreiben:

- Die Anwesenheit einer großen Anzahl in progressiven Läsionen, verglichen mit ihrer Abwesenheit bzw. ihrer Anwesenheit in kleinen Zahlen in nicht progressiven Läsionen
- Ihre Elimination hat Regeneration bzw. Reparation des erkrankten Gewebes zur Folge
- Der Wirt reagiert mit einer spezifischen Immunantwort
- Sie drücken Virulenzfaktoren aus, die zur Manifestation der Erkrankung beitragen
- Im Tierversuch wird eine ähnliche Gewebsdestruktion durch diese Keime erreicht

### ***Actinobacillus actinomycetemcomitans***

*A. actinomycetemcomitans* ist ein kleines, unbewegliches mikroaerophiles Stäbchen, welches nach Anzucht kleine, helle Kolonien bildet. Er kann bei der chronischen als auch bei der aggressiven Form der Parodontitis isoliert werden (Fives-Taylor 1999). Als Virulenzfaktoren werden Kollagenasen, Proteasen, Hyaluroidasen, ein Fibroblasten hemmender Faktor und ein sehr starkes Endotoxin gebildet. Zusätzlich kann *A. actinomycetemcomitans* ein sehr starkes RTX-Leukotoxin bilden, welches hoch spezifisch durch Veränderung der

Zellpermeabilität PMN und Makrophagen abtötet (Berthold et al. 1992 und Kolodrubetz 1996). Im Zytoplasma des Y4-Stammes wurde ein Molekül isoliert, welches als Suppressor-Faktor-1 (SF-1) bezeichnet wurde. SF-1 ist in der Lage, die Proliferation von T-Zellen sowie die Produktion von Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-5 und Interferon- $\gamma$  zu unterdrücken, wodurch in die Immunantwort eingegriffen wird (Kurita-Ochiai 1996).

*A. actinomycetemcomitans* kann sich an Weichgewebe wie Zellen oder Hartgewebe wie Hydroxylapatit anlagern und eine bemerkenswert feste unspezifische Bindung eingehen. Verantwortlich hierfür ist die Ausbildung von Fibrillen (Flp1), welche von mindesten 12 Genen auf dem Tad-Genlocus exprimiert werden (Schreiner et al. 2003).

Einen entscheidenden Schritt, sich der Immunantwort zu entziehen, stellt die Internalisierung in Zellen wie Epithelzellen dar. Die Mehrzahl der Stämme von *A. actinomycetemcomitans* scheint einen Aktin-abhängigen, eine Minderheit einen Aktin-unabhängigen Prozess zur Initialisierung einzuleiten (Brissette und Fives-Taylor 1998). Für weitere intra- und interzelluläre Bewegungsabläufe scheinen die Mikrotubuli des Cytoskeletts eine Rolle zu spielen. Kinesin- oder Dynein ähnliche Proteine auf der Bakterienoberfläche vermitteln den Kontakt zu den Mikrotubuli der Zelle (Meyer et al. 1999).

### ***Porphyromonas gingivalis***

*P. gingivalis* ist ein anaerob wachsendes, gramnegatives, unbewegliches Stäbchen. Es wird häufig in rasch voranschreitenden Parodontopathien nachgewiesen (Moore und Moore 1994). *P. gingivalis* ist in der Lage, eine Reihe von Virulenzfaktoren zu bilden. Dazu gehören die Ausbildung von Fimbrien, die der Adhäsion dienen, die Produktion von verschiedenen proteolytischen Enzymen, den Gingipainen, und die Bildung von LPS. Weiterhin wirken auch Stoffwechselprodukte, wie z.B. Propionate, proinflammatorisch (Pöllänen et al. 1997).

Die Gingipaine machen 85 % der proteolytischen Kapazität (Potempa et al. 1997) und 100 % der Trypsin-ähnlichen Aktivität aus (Potempa et al. 1995) und sind somit maßgeblich für die Expression der Virulenz verantwortlich. Gingipain R ist eine Arginin-spezifische Cysteinendopeptidase und wird von den Genen *rgpA* und *rgpB* transkribiert. Gingipain K ist eine Lysin-spezifische Endopeptidase und wird von dem *kgp*-Gen kodiert. Wirtsproteine, die durch die Gingipaine in vitro abgebaut werden, sind Proteine der extrazellulären Matrix, wie Laminin, Fibronectin, und Kollagen des Typs III, IV und V (Potempa et al. 2000). Trotz dieser großen proteolytischen Kompetenz kann die parodontale Gewebsdestruktion nicht allein auf die Gingipaine zurückgeführt werden. Allerdings sind Gingipain K und Gingipain R in der Lage, die wirtseigenen Proteinasen MMP-1, MMP-3 und MMP-9 zu aktivieren (De Carlo et al. 1997). Zusätzlich ist Gingipain R für eine erhöhte vaskuläre Permeabilität, für eine verstärkte Bindung von Fimbrien an Fibroblasten und die Zerstörung von Komplementfaktoren verantwortlich. Gingipain K hat ähnliche Kompetenzen wie Gingipain R, ist aber zusätzlich sehr stark Fibrinogen spaltend (Pike et al. 1994). Darüber hinaus kann *P. gingivalis* den chemotaktischen Gradienten von IL-8 durch die hydrolytische Spaltung des Interleukins stören, wodurch die Rekrutierung von Leukozyten behindert wird (Darveau et al. 1998).

Fimbrien vermitteln spezifisch den Kontakt zu Oberflächenrezeptoren an Epithelzellen oder mit Speichel benetztem Hydroxylapatit. Auch die Aggregation mit andern Oralkeimen wie *Streptococcus gordonii* oder *Actinomyces viscosus* wird beschrieben (Li et al. 1991 und Lamont 1992). Zusätzlich wurden noch Oberflächenproteine (Adhäsine) auf *P. gingivalis* gefunden, die ebenfalls Kontakt vermitteln können (Lamont et al. 1994).

Internalisierung und die quantitative Adhäsion scheinen in keinem direkten Verhältnis zu stehen und sind stammspezifisch sehr unterschiedlich (Eick et al. 2002). Jedoch steht die Interaktion mit bestimmten Adhäsinen mit der nachfolgenden Internalisierung in Zusammenhang. Weinberg und Kollegen haben 1996 auf der Oberfläche von KB-Zellen ein 48 kDa schweres Protein

gefunden, welches mit der Internalisierung in Verbindung steht (Weinberg et al. 1997).

Das LPS von *P. gingivalis* besitzt eine starke antigene Wirkung und kann verschiedene Zellen zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren anregen. So wird in Fibroblasten die Ausschüttung von IL-1 $\beta$  und IL-6 und in Makrophagen und Monozyten die Freisetzung von PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  ausgelöst (O' Brien-Simpson et al. 2004).

Oralpathogene Keime weisen somit ein ganzes Arsenal von Möglichkeiten auf, wie sie sich der körpereigenen Abwehr entziehen, bzw. Abwehrprozesse zu ihren Gunsten verändern können.



### **3 Zielstellung**

Die Arbeit sollte untersuchen, ob Serum oder einzelne Komponenten des Serums in der Lage sind, in das Adhärenz- und Invasionsverhalten von *P. gingivalis* ATCC 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 einzugreifen. Ferner sollte untersucht werden, ob Serum oder Serumbestandteile die Zytokinantwort der proinflammatorischen Interleukine IL-6 und IL-8 verändern. Dies sollte an KB- Zellen und Fibroblasten untersucht werden. Um Unterschiede in der Wirkung zwischen Bakterien und Zellen feststellen zu können, wurden diese jeweils eine Stunde vorinkubiert bzw. sofort in den Versuch eingebracht. Für die Versuche wurden Serumkonzentrationen von 2,5 %, 5 % und 10 % verwendet.

In den Zeitintervallen 1 h, 6 h und 18 h wurden Versuchswerte wie Keimzahlen (freie, adhärenzte und internalisierte Bakterien) und ausgeschüttete Interleukinmengen (IL-6 und IL-8) abgenommen.

Neben dem Serum von gesunden Personen wurde auch der Einfluss eines Patientenserums analysiert. Dieses Serum stammte von einem Patienten mit einer aggressiven Parodontitis in dessen Plaqueproben *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* nachgewiesen wurden.

Um den Effekt von Bluteiweißen wie Albumin untersuchen zu können wurde dieses in Mengen von 25 mg/ml, 50 mg/ml und 100 mg/ml in einer weiteren Versuchsreihe zugesetzt.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Die Zellpassage**

Es wurden für die Versuche zwei verschiedene Zelltypen verwendet. Zum einen wurden Epithelzellen (KB-Zellen), zum anderen humane Fibroblasten der Gingiva verwendet. KB-Zellen haben ihren Ursprung aus einem humanen, oralen, Epidermoidkarzinom und entsprechen einer permanenten Zelllinie. Die Fibroblasten stammen von der Wurzeloberfläche eines Seitenzahnes.

Als Ausgangsbasis dienten zwei mit einem dichten Zellrasen bewachsene 250-ml-Gewebekulturflaschen (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland). Die KB-Zellen wurden mit dem Nährmedium EMEM (BioWhittaker, Verviers, Belgien) unter Zusatz von 10%igem fetalem Kälberserum (FCS von Gibco BRL, Paisley, UK) kultiviert. Für die Anzucht der Fibroblasten wurde als Nährmedium DMEM (Gibco BRL, Paisley, UK) mit einem Zusatz von 10%igem fetalem Kälberserum benutzt.

Für die Versuche selbst wurden die Zellen auf 24-Well-Zellkulturplatten (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland) passagiert. Dafür wurde unter der Laminarbox das alte Medium abgesaugt und die an der Flasche haftenden Zellen wurden mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS) gespült. Um die Zellen abzulösen, wurde 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (5%) den Zellen zugegeben und die Flaschen wurden 5 Minuten zurück in den Inkubator gestellt. Nach diesem Zeitraum waren die Zellen als weißer Schleier sichtbar. KB-Zellen wurden nun mit 2 ml EMEM mit 10 % FCS, Fibroblasten mit 2ml DMEM mit 10% FCS vermischt und in ein Gewebekulturröhrchen (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland) gegeben. Anschließend wurden die Zellen 4 min bei 1400 U/min zentrifugiert, wodurch die Zellen nun wieder als weißer Bodenbelag sichtbar wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden mit 2 ml des jeweiligen Mediums mit abgesaugt und in ein Becherglas gegeben, welches mit 38 ml Nährmedium gefüllt war. Die Suspension wurde durchmischt und anschließend auf drei verschiedene 24-Well-Platten mit jeweils 500 µl pro Well pipettiert. Die Platten wurden wieder bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C 48

Stunden vor Versuchsbeginn inkubiert. In dieser Zeit konnten die Zellen in der Suspension absinken und einen Monolayer auf dem Wellboden bilden.

## **4.2 Verwendete Medien und Zusätze**

Bei den Keimen, die bei den Versuchen verwendet wurden, handelte es sich um *P. gingivalis* ATCC 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y 4. *P. gingivalis* wurde in luftdicht verschließbare Behälter mit einem Anaerobiersystem (Oxoid, Basingstoke, UK) und bei 37°C auf Schaedler-Agar kultiviert. *A. actinomycetemcomitans* wurde unter mikroaerophilen Verhältnissen mit 5 % CO<sub>2</sub> und ebenfalls bei 37°C im Inkubator kultiviert.

In den eigentlichen Versuchen wurde auf den Zusatz FCS in den Nährmedien verzichtet. Es wurde EMEM für KB-Zellen bzw. DMEM für Fibroblasten verwendet.

In den meisten Versuchsreihen wurde humanes Serum gesunder Probanden (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) benutzt. In weiteren Versuchen wurde Serum eines Patienten mit bekannter Infektion mit *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* geprüft. Das Serum wurde jeweils in einer Endkonzentration von 2,5 %, 5 % und 10 % zugesetzt. In der letzten Versuchsreihe wurde Serum komplett substituiert. Stattdessen wurde zu der Versuchssuspension humanes Serumalbumin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), ein Bestandteil des natürlichen, filtrierten Serums, in einer Konzentration von 25 mg/ml, 50 mg/ml und 100 mg/ml verwendet.

## **4.3 Versuchsdurchführung**

### **Herstellung der Bakteriensuspension**

Für die Versuche wurde 48 Stunden vor Versuchsbeginn der betreffende Bakterienstamm auf eine Schaedler-Agarplatte überimpft. Der Stamm war somit in der frühen stationären Wachstumsphase. Nach Inkubation wurden mit einem sterilen Wattetupfer Bakterienkolonien von der Agar-Platte abgenommen. Der

Abstrich wurde mit einfach konzentriertem Medium 199 (Gibco BRL, Paisley, UK) in Suspension gebracht. Die Bakteriendichte wurde photometrisch eingestellt. Für den Versuch wurde eine optische Dichte von 0,1 bei einer Wellenlänge von 640 nm verwendet, was einer Bakterienkonzentration von  $10^8$  Bakterien/ml entspricht.

### Vorinkubation der Zellen

Für die Versuche mit Vorinkubation der Zellen wurden die vorbereiteten 24-Well-Platten nach folgendem Verteilungsschema (Tabelle 1) mit den Zusätzen 1 Stunde bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. In jedes Well wurden 0,5 ml der Lösung pipettiert.

Tabelle 1 Versuchsansatz bei Vorinkubation der Zellen

	Medium EMEM/DMEM (ml)	PBS (µl)	Serum (µl)
Reihe 1	9	1000	-
Reihe 2	9	750	250
Reihe 3	9	500	500
Reihe 4	9	-	1000

Nach erfolgter Inkubation wurden die Überstände abgesaugt und mit PBS gespült. Danach wurden je 0,5 ml Lösung von Medium und PBS im Verhältnis von 9:1 in jedes Well der Kontrollen gegeben. Die Bakteriensuspension wurde im gleichen Verhältnis wie die Kontrolle in das Medium gegeben und wie in Abb. 1 pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellkulturplatten für 1 h, 6 h und 18 h.

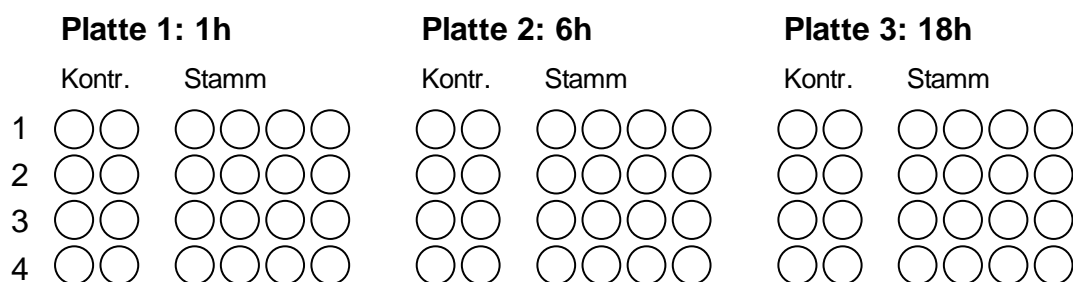


Abb.1  
Pipettierschema der Suspension

### Vorinkubation der Bakterien

Hierfür wurden die Bakterien mit PBS nach MacFarland Standard 4 verdünnt und nachfolgend für eine Stunde mit Serum bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Verteilungsschema ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2 Vorinkubation der Bakterien

	<b>Bakteriensuspension (µl)</b>	<b>PBS (µl)</b>	<b>Serum (µl)</b>
Reihe 1	1800	200	-
Reihe 2	1800	150	50
Reihe 3	1800	100	100
Reihe 4	1800	-	200

Anschließend wurden die Bakterien mit PBS gewaschen, 10 min bei 12.000 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und eine Bakterienkonzentration von OD<sub>640nm</sub> = 0,1 eingestellt. Für den weiteren Versuch wurden Medium und Bakteriensuspension bzw. PBS im Verhältnis 9:1 vermischt und in jedes Well 0,5 ml wie in Abb. 1 gegeben. Nach 1 h, 6 h und 18 h wurden die Proben entnommen.

### Zugabe des Serums zum Zeitpunkt der Infektion

Für diesen Versuch wurde folgender Versuchsansatz (Tabelle 3) mit der Bakteriensuspension vorbereitet:

Tabelle 3 Versuchsansatz mit Bakterien

	<b>Medium EMEM/DEMEM (ml)</b>	<b>Bakteriensuspension (µl)</b>	<b>PBS (µl)</b>	<b>Serum (µl)</b>
Reihe 1	6,08	667	750	-
Reihe 2	6,08	667	562,5	187,5
Reihe 3	6,08	667	375	375
Reihe 4	6,08	667	-	750

Als Kontrolle wurde eine Lösung aus EMEM bzw. DMEM, PBS und Serum hergestellt (Tabelle 4).

Tabelle 4 Kontrolle ohne Bakterien

	<b>Medium EMEM/DEMEM (ml)</b>	<b>Bakteriensuspension (<math>\mu</math>l)</b>	<b>PBS (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Serum (<math>\mu</math>l)</b>
Reihe 1	3,08	-	710	-
Reihe 2	3,08	-	616,25	93,75
Reihe 3	3,08	-	522,5	187,5
Reihe 4	3,08	-	335	375

Die Verteilung der Suspensionen erfolgte wie in Abb.1 dargestellt. Wie in den anderen Versuchen wurden die Proben in den Zeitintervallen von 1 h, 6 h und 18 h entnommen.

Für die Versuche, in denen das Serum durch Albumin substituiert wurde, wurde eine Versuchssuspension mit einer Konzentration von 0,1 g/ml für die 2. Reihe der Gewebekulturplatte gewählt. In fallender Konzentration wurde für die 3. Reihe eine Albuminkonzentration von 0,05 g/ml und für die letzte Reihe eine Konzentration von 0,025 g/ml gewählt. Die 1. Reihe fungierte als Negativkontrolle.

Für die Versuchsdauer wurden die Gewebekulturplatten wieder bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert.

### **Gewinnung der Proben**

Die Proben wurden nach 1 Stunde, nach 6 Stunden und nach 18 Stunden für die weitere Verarbeitung entnommen. Nach Ablauf der Zeit wurde die Inkubation abgebrochen, unter der Laminarbox 450 $\mu$ l pro Well abpipettiert, in 1,5-ml-Eppendorfröhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben und 10 min bei 12.000 g zentrifugiert, um eine zellfreie Lösung zu bekommen. Nach dem Zentrifugieren wurde aus den Eppendoftubes ein Überstand von 375  $\mu$ l entnommen und in Cytro-röhrchen (Greiner Bio-one, Frickenhausen,

Deutschland) pipettiert, die für die spätere Interleukinbestimmung bei -20°C sofort eingefroren wurden.

Für die Bestimmung der freien Bakterienzahl wurden innerhalb jeder Reihe zweimal 2,5 µl pro infiziertem Well entnommen und in einem Verhältnis von 1:100 in Eppendorftubes mit PBS verdünnt und durchmischt. 100 µl dieser Suspension wurden auf einer Schaedlerplatte ausgestrichen und inkubiert. Mit *A. actinomycetemcomitans* beimpfte Agarplatten wurden bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C fünf Tage inkubiert, mit *P. gingivalis* beimpfte Agarplatten wurden anaerob, aber unter sonst gleichen Bedingungen inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zahl der koloniebildenden Einheiten ermittelt.

#### **4.4 Interleukinnachweis**

In diesem Versuchsdesign sollte das Augenmerk gezielt auf die Interleukine IL-6 und IL-8 gelegt werden. Für den Nachweis von sezernierten Produkten wie Interleukine eignet sich die sog. Sandwich- oder Capture-ELISA. Hierbei werden im Vergleich zum konventionellen ELISA antigenspezifische Antikörper an den Träger gebunden. Die antigenträgenden Proben werden hinzugegeben und anschließend ein Detection-Antikörper, der mit einem Enzym markiert ist. Das Enzym setzt das farblose Substrat in ein farbiges Produkt um, wobei der Farbumschlag als Extinktion in einem Mehrkanalspektrometer erfasst werden kann.

Für die quantitative Messung wurde die Extinktion der Proben mit einer Standardkurve verglichen. Diese Standardkurve wurde durch eine Verdünnungsreihe mit bekannter Antigenkonzentration erreicht. Je stärker die Extinktion desto mehr Substrat war umgesetzt worden, was als Rückschluss auf die Interleukinkonzentration diente.

#### 4.4.1 Verwendete Lösungen und Zusätze

Für die Interleukinbestimmung wurden spezifische Testkits (CytoSets™, BioSource, Ratingen, Deutschland) verwendet. Für die Durchführung wurden zudem verschiedene Puffer und Lösungen angesetzt:

Coating-Puffer:	PBS
Blockingpuffer:	PBS + 40 g Rinderserumalbumin (Fraktion V) pro Liter
Standardpuffer:	PBS + 5,0 g Rinderserumalbumin (Fraktion V) + 1 ml TBS Tween 20 pro Liter
Waschlösung:	9,0 g NaCl, + 1 ml TBS Tween 20 pro Liter, pH 7,4
Stopplösung:	0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Substrat:	TMB

#### 4.4.2 Durchführung des Interleukinnachweises

Für den Interleukinnachweis wurden 96-Well-Mikrotiterplatten (Immuno Modules, Nunc A/S Roskilde, Dänemark) und die Testkits verwendet. Zur Vorbereitung wurden die Mikrotiterplatten mit PBS gespült und danach der Coating-Antikörper zur Beschichtung pipettiert. Die Antikörperlösung wurde vorher im Verhältnis 1: 1.000 mit PBS verdünnt und 100 µl pro Well aufgetragen. Die Platten wurden mit einer selbstklebenden Folie abgedeckt und bei 2-8°C 12-18 Stunden im Kühlschrank inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurde der überschüssige Coating-Antikörper abgesaugt und 300 µl des Blockingpuffers pro Well aufgetragen, um die verbleibenden adhäsiven Stellen zu blockieren. Die Mikrotiterplatten wurden wieder mit Folie abgeklebt und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurde der Blockingpuffer abgesaugt und die Platten wurden dreimal mit 400 µl pro Well Waschlösung gespült.



Im nächsten Schritt wurden nun die Proben bzw. der Standard aufgetragen. Um den Standard im richtigen Konzentrationsverhältnis zu bekommen, musste er mit Aqua dest. so weit verdünnt werden, bis er in einer Anfangskonzentration von 10.000 pg/ml vorlag. In einer Verdünnungsreihe wurden mit dem Standardpuffer weitere Konzentrationen von 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,675 pg/ml und eine Nullkontrolle angefertigt. Von diesen Lösungen wurden je 100 µl pro Well pipettiert. Ebenso wurde die zu prüfende Probe entsprechend auf die Platten gegeben.

Danach wurde sofort der Detection-Antikörper aufgetragen, der im Verhältnis 1:250 mit dem Blockpuffer verdünnt worden war. Es wurden 50 µl pro Well pipettiert, die Platten wurden wieder abgeklebt und unter leichten Bewegungen auf dem Laborrüttler bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert.

Es schloss sich ein weiterer Waschvorgang mit jeweils 400 µl pro Well an. Nach diesem Spülvorgang wurde das Konjugat (Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase), welches im Verhältnis 1:4.000 mit PBS verdünnt worden war, aufgetragen. Die Platten wurden wieder abgeklebt und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert.

Danach wurden die Platten abermals dreimal mit der Waschlösung gespült und im Anschluss wurden 100 µl Substrat, Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), pro Well zugegeben. Die Platten wurden dieses Mal verdunkelt und nicht abgeklebt 30 min inkubiert. In dieser Zeit wurde das farblose Substrat in ein blaues Produkt umgewandelt. Diese Reaktion wurde mit der Zugabe von 50 µl 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pro Well beendet, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfand.

Innerhalb von 30 min erfolgte die Auswertung des Versuchs mit Hilfe des Mehrkanalspektrometers ELISA-Reader (Spectra Rainbow, TECAN, Crailsheim, Deutschland). Es wurden ein Messfilter von 450 nm und ein Referenzfilter von 650 nm verwendet. Mit der dazugehörigen Software wurde die optische Dichte des Standards auf die Konzentration des Standards

logarithmisch aufgetragen und eine Standardgerade berechnet. Anhand dieser Standardgerade konnte nun jede Probenkonzentration ermittelt werden.

## **5 Ergebnisse**

In diesem Abschnitt wird dargestellt, wie Serum von einem gesunden Probanden sowie von einem Patienten mit aggressiver Parodontitis (in Plaqueproben wurde sowohl *P. gingivalis* ATCC 33277 als auch *A. actinomycetemcomitans* Y 4 nachgewiesen) und humanes Serumalbumin die Anzahl der an KB-Zellen bzw. Fibroblasten adhären, intrazellulären und freien KBE beeinflussen. Weiterhin erfolgt die Angabe der von den KB-Zellen und Fibroblasten freigesetzten Mengen an IL-6 und IL-8. Die Ergebnisse zu den Bakterienzahlen stellen jeweils die aus mindestens vier Einzelwerten gewonnenen Medianwerte dar. Bei den Interleukinnachweisen erfolgte eine Doppelbestimmung.

### **5.1 Einfluß von Serum und Albumin auf *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 bei KB-Zellen**

Es werden die KBE der Keime *P. gingivalis* 33277 bzw. *A. actinomycetemcomitans* Y4 dargestellt, die sich frei im Nährmedium befanden, an den Zellen anhafteten oder in die Zellen eindrangen. Dabei wurde untersucht, wie sich das Adhärenz- und Invasionsverhalten änderte, wenn die Bakterien oder die Zellen mit Serum 1 Stunde vorinkubiert oder gleichzeitig infiziert wurden.

#### **Anzahl der freien Bakterien im Nährmedium zu verschiedenen Infektionszeitpunkten**

Bei Vorinkubation der Zellen mit Serum konnte nach einer Versuchsdauer von 1 Stunde und 6 Stunden eine Steigerung der freien Bakterienzahlen von *P. gingivalis* festgestellt werden. Im Vergleich zur Kontrolle konnte bei einer Serumkonzentration von 5 % die höchste Anzahl nachgewiesen werden. Die Steigerung betrug nach einer Stunde 24 % und 80 % nach 6 Stunden. Bei *A. actinomycetemcomitans* konnte in diesem Zeitraum keine serumabhängige Veränderung bei den freien Bakterienzahlen festgestellt werden.

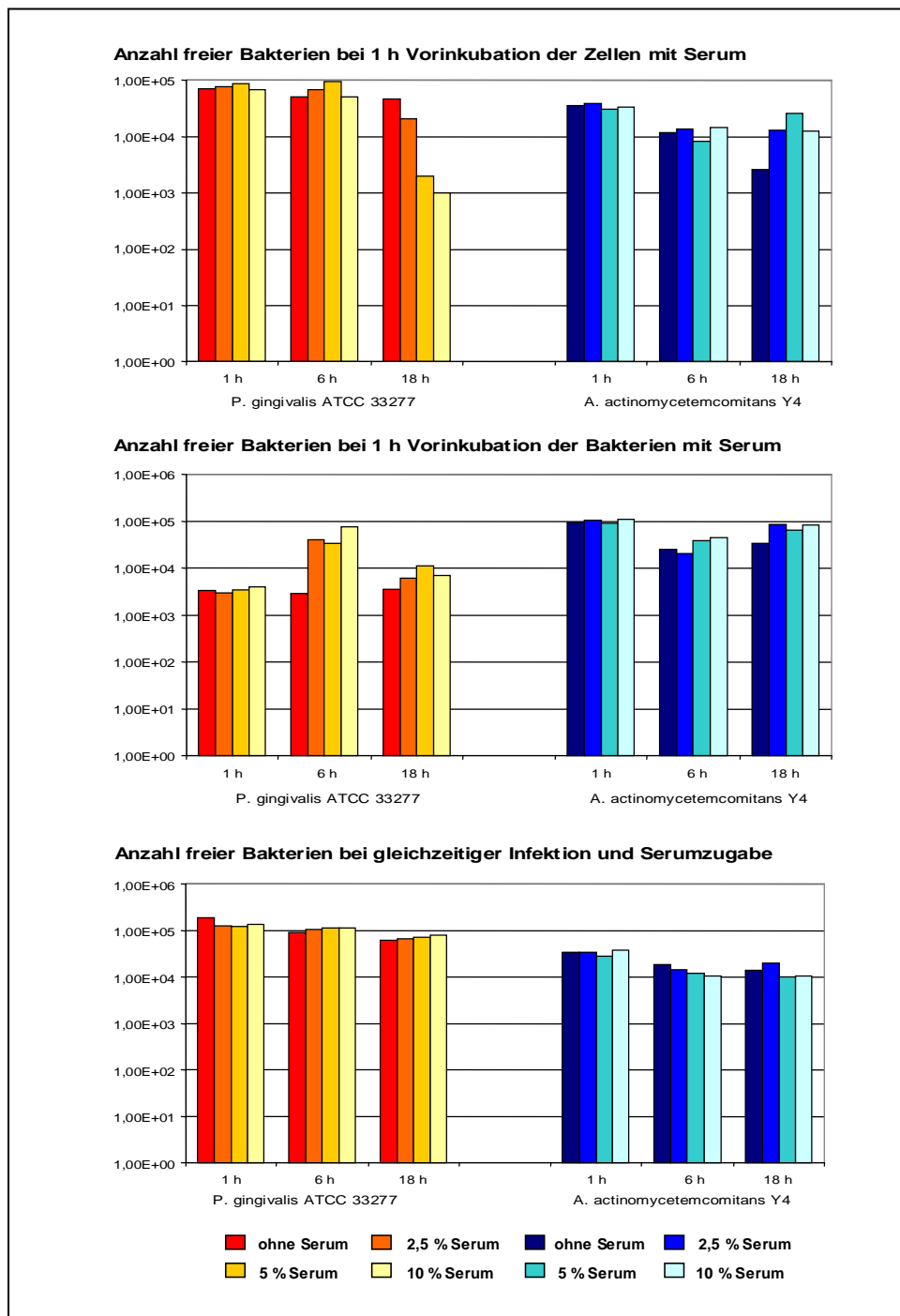


Abb. 2  
KBE frei vorkommender Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 unter Einfluss von Serum im Zusammenhang mit KB-Zellen

Wurden die Keime mit Serum vorinkubiert, konnte bei *P. gingivalis* nach 6 Stunden und 10 % Serumzusatz ein Anstieg um das 26fache nachgewiesen werden. Die Anzahl von freien *A.-actinomycetemcomitans*-Keimen stieg nach 18 Stunden und 10 % Serum um das 24fache an.

Eine konzentrationsabhängige Steigerung der freien *P.-gingivalis*-Keime konnte bei gleichzeitiger Infektion beobachtet werden. Nach 6 und 18 Stunden wurden um 22 % und 31 % höhere Zahlen ermittelt. Bei *A. actinomycetemcomitans* konnte kein Einfluss festgestellt werden (vgl. Abb. 2 und Tab. 5 im Anhang).

### **Anzahl der adhärenenten Keime zu verschiedenen Infektionszeitpunkten**

Wurden die Zellen mit Serum vorinkubiert, konnte bei *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* jeweils nach 6 und 18 Stunden eine Hemmung der Adhärenz gezeigt werden. So fiel die Anzahl von adhärenenten *P.-gingivalis*-Keimen bei 10 % Serum nach 6 bzw. 18 Stunden um 60 % bzw. 80 %. Im gleichen Zeitraum sanken die adhärenenten *A.-actinomycetemcomitans*-Keime auf 62 % bzw. 81 % im Vergleich zur serumfreien Kontrollgruppe.

Adhärenzfördernd zeigte sich die Serumzugabe bei der Vorinkubation von *P. gingivalis*. Nach 6 Stunden stieg die Zahl der adhärenenten Keime um das 56fache bei 2,5 % Serum an und nach 18 Stunden wurde bei 10 % Serum eine 317fache Zunahme nachgewiesen. *A. actinomycetemcomitans* erwies sich demgegenüber weitaus unempfindlicher, die Zahl adhärenenter Bakterien war nach 18 Stunden und 10 % Serumzusatz nur um das 1,32fache erhöht.

Bei simultaner Infektion konnte eine Förderung der Adhärenz von *P. gingivalis* erst nach 18 Stunden beobachtet werden. Dabei wurde die höchste Keimzahl bei 2,5 % Serum gemessen. Ähnlich waren die Ergebnisse bei *A. actinomycetemcomitans*, hier wurden ebenfalls nach 18 Stunden und 2,5 % Serumzugabe die höchsten Werte ermittelt. Allerdings waren bei 10 % Serumzugabe im Vergleich zur Kontrolle weniger adhärenente Keime nachweisbar (vgl. Abb. 3 und Tab. 6 im Anhang).

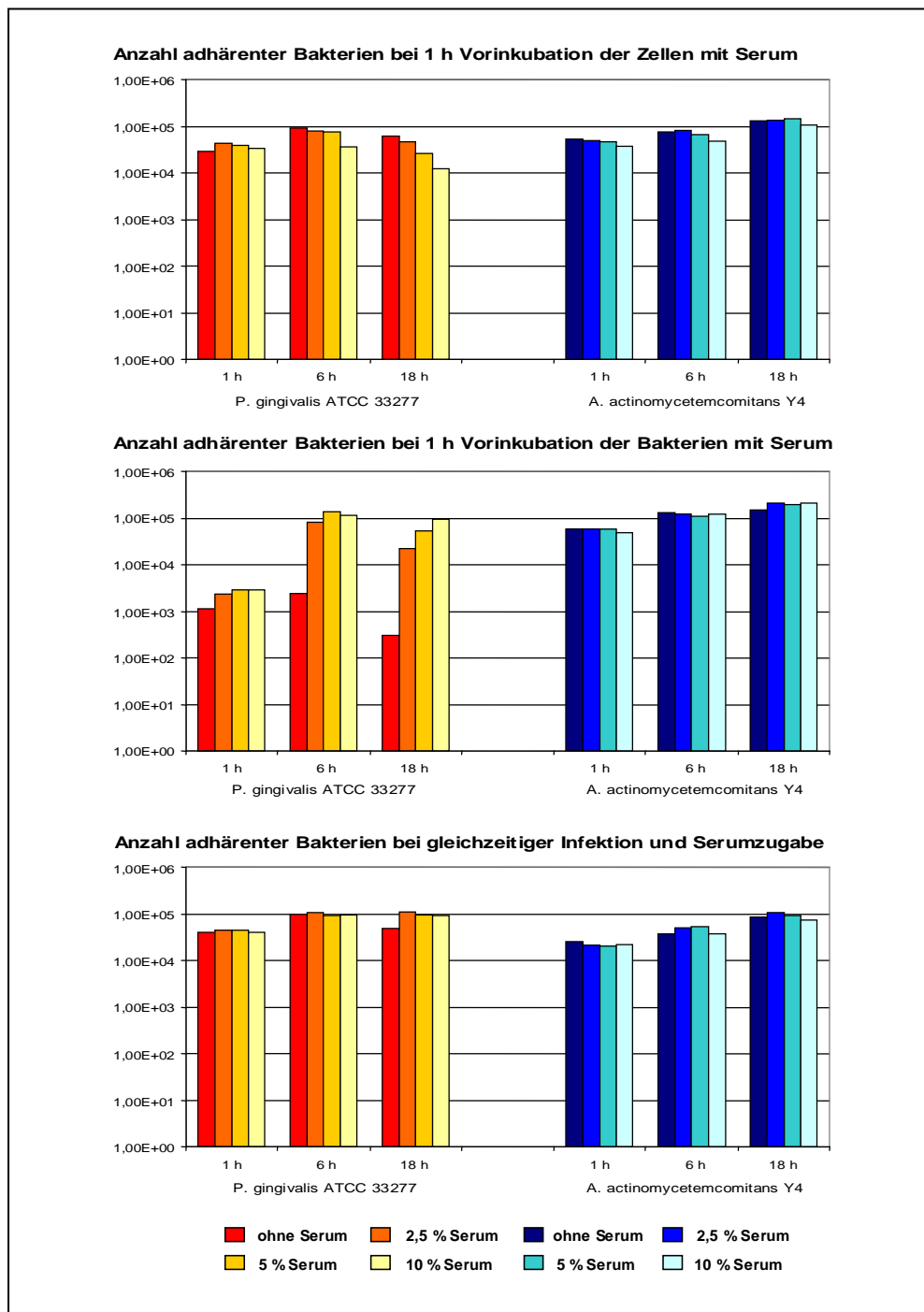


Abb. 3  
KBE adhärenter Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 nach Vorinkubation oder gleichzeitiger Infektion von KB-Zellen

## Anzahl der internalisierten Keime zu verschiedenen Infektionszeitpunkten

Bei den vorinkubierten Zellen konnten nach 6 und 18 Stunden keine Unterschiede im Invasionsverhalten von *P. gingivalis* festgestellt werden.

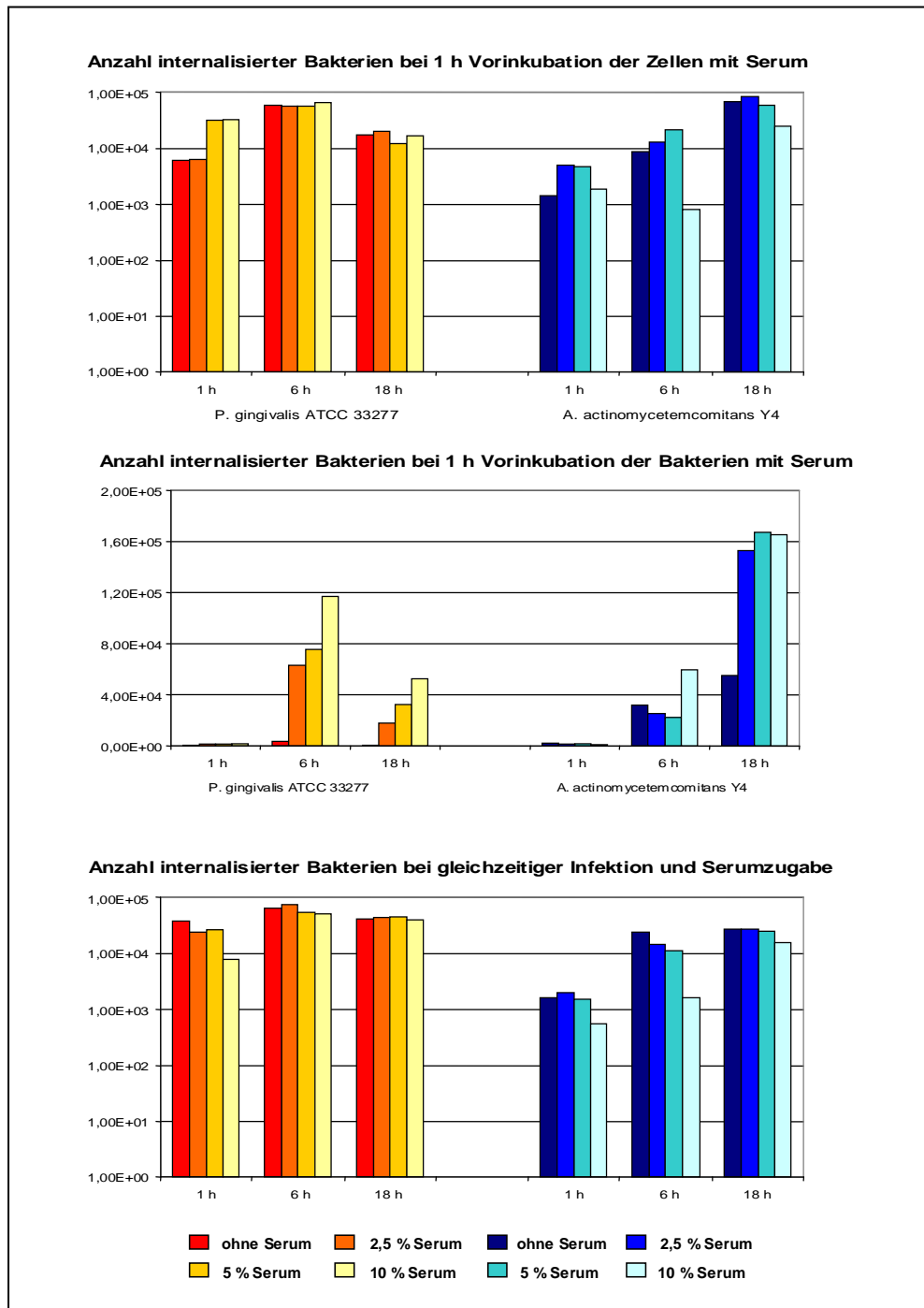


Abb. 4  
KBE internalisierter Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 nach Vorinkubation oder gleichzeitiger Infektion von KB-Zellen

Bei *A. actinomycetemcomitans* konnte zur selben Zeit eine Abnahme auf 9,2 % und 36,3 % verzeichnet werden.

Die Vorinkubation der Bakterien mit Serum konnte bei *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* eine deutliche Steigerung der Invasion hervorrufen. Bei 10 % Serumzugabe wurde nach 6 und 18 Stunden ein 33,5facher bzw. ein 131facher Zuwachs von internalisiertem *P. gingivalis* nachgewiesen. Bei *A. actinomycetemcomitans* konnte eine Erhöhung um das 1,8fache und 3fache im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden.

Bei gleichzeitiger Infektion und Serumzugabe war bei beiden Stämmen eine tendenzielle Abnahme zu beobachten (Abb. 4 und Tab. 7 im Anhang).

### **Auswirkung von Patientenserum auf freie Bakterien im Nährmedium und das Adhärenzverhalten**

Wurden die Versuche mit Patientenserum durchgeführt, konnten nach 6 Stunden 26300 KBE bei 10 % Serumzugabe von *P. gingivalis* nachgewiesen werden. Das entspricht einem Zuwachs um 27 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 18 Stunden stieg die Zahl der frei im Serum verfügbaren Keime von *P. gingivalis* um das 8,4fache an. Bis zu einer Serumkonzentration von 5 % konnte eine dosisabhängige Steigerung der freien *A. actinomycetemcomitans*-Keime nach 6 Stunden gezeigt werden. Nach einer Versuchsdauer von 18 Stunden wurden die meisten freien Keime bei einer Serumkonzentration von 10 % ausgezählt.

Bis 5 % Serumzusatz konnte nach 18 Stunden eine dosisabhängige Steigerung der adhärennten *P. gingivalis*-Keime nachgewiesen werden. Bei 5 % Serumzugabe zeigte sich ein Zuwachs um 87 %. Im Adhärenzverhalten konnte bei *A. actinomycetemcomitans* nach 6 Stunden kein Einfluss nachgewiesen werden. Nach 18 Stunden wurde eine leichte Hemmung nachgewiesen (vgl. Abb. 5 und Tab. 8 im Anhang).



Bei diesen Versuchen wurde aufgrund des nur begrenzt zur Verfügung stehenden Serums auf die Bestimmung der Zahl internalisierter Bakterien verzichtet.

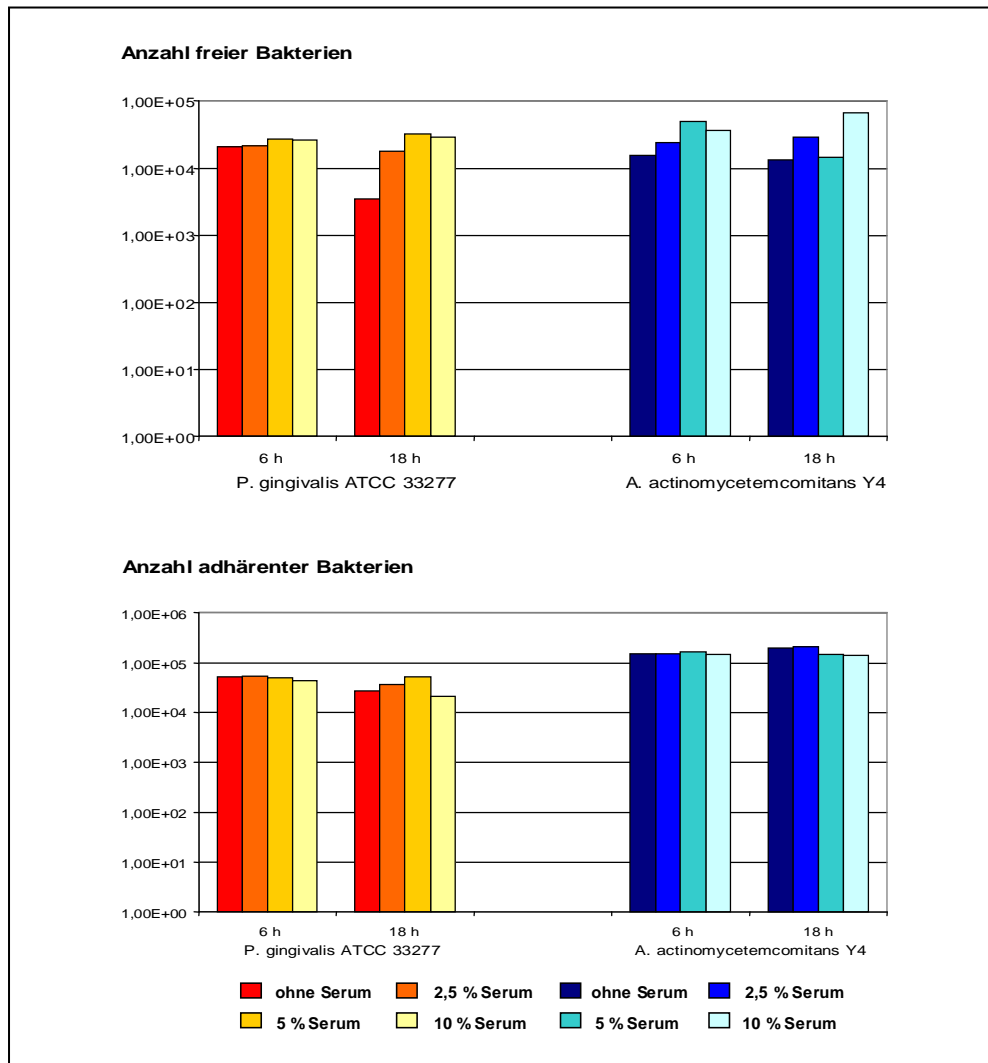


Abb. 5  
 KBE freier und adhärenter Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 nach gleichzeitiger Zugabe von Patientenserum und Infektion von KB-Zellen

### **Einfluss von humanem Serumalbumin auf *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* bei KB-Zellen**

Humanes Serumalbumin (HSA) konnte bei gleichzeitiger Zugabe und Infektion von KB-Zellen durch *P. gingivalis* keine Veränderung der freien Keime hervorrufen. Die Anzahl freier *A. actinomycetemcomitans*-Keime ging tendenziell zurück.

Die Adhärenz der beiden Keime konnte durch die Zugabe von HSA gehemmt werden. Im Vergleich zur Kontrolle gingen die Zahlen der adhärenenten Keime um 84,6 % (*P. gingivalis*) und 97,6 % (*A. actinomycetemcomitans*) bei einem HSA-Zusatz von 100 mg/ml zurück.

Mit der sinkenden Anzahl der adhärenenten Keime gingen auch die internalisierten Keime zurück. Bei 100 mg/ml HSA wurden intrazellulär 82,8 % weniger *P.-gingivalis*- und 97,9 % weniger *A.-actinomycetemcomitans*-Keime nachgewiesen (vgl. Abb. 6 und Tab. 9 im Anhang).

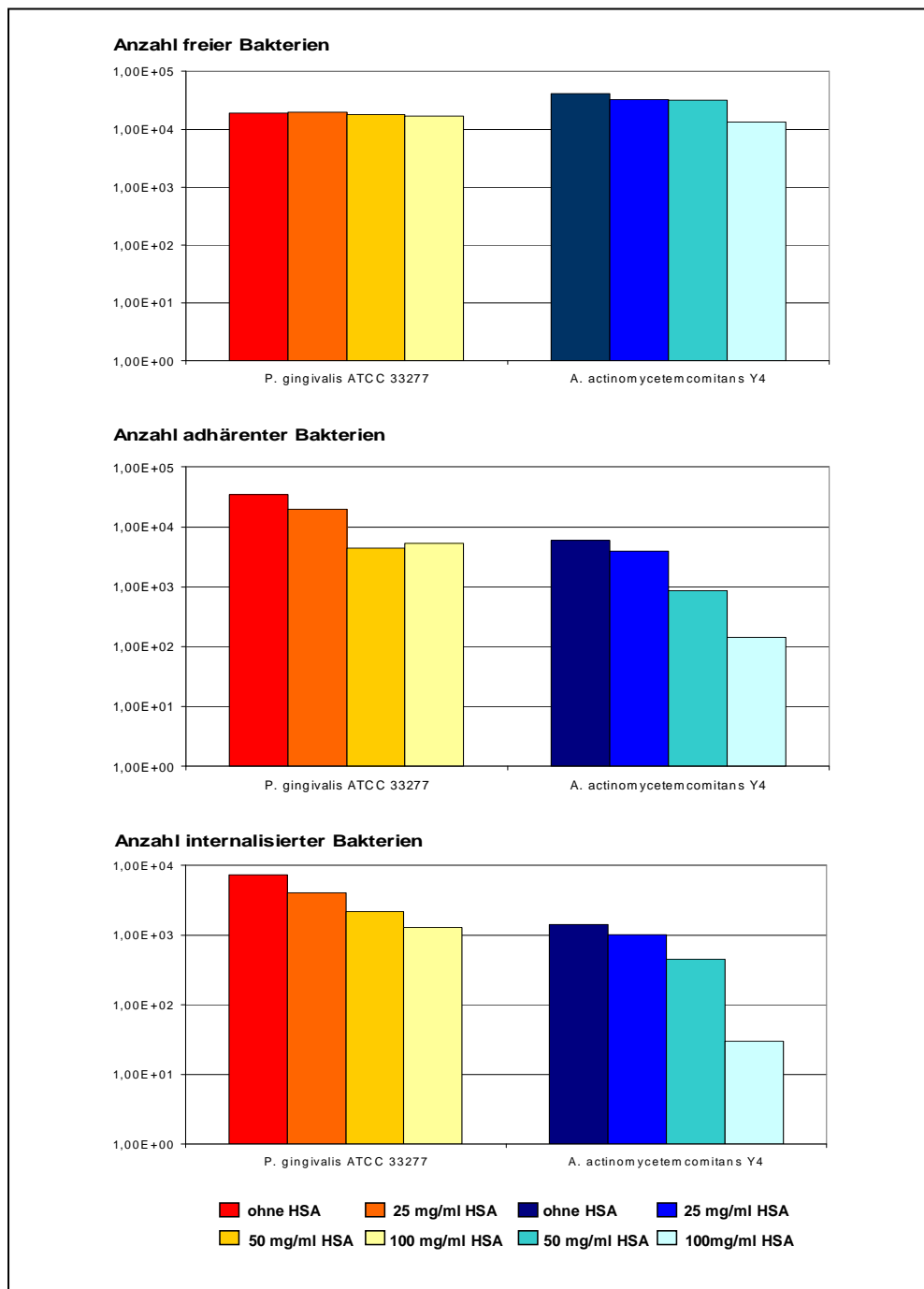


Abb. 6  
KBE freier, adhärenter und internalisierter Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 nach gleichzeitiger Zugabe von HSA und Infektion von KB-Zellen und einer Inkubationszeit von 6 h

## **5.2 Einfluß von Serum und Albumin auf *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 im Zusammenhang mit gingivalen Fibroblasten**

### **Anzahl der freien Bakterien im Nährmedium zu verschiedenen Infektionszeitpunkten**

Wurden Fibroblasten mit Serum vorinkubiert, so konnte nach 6 und 18 Stunden Versuchsdauer eine dosisabhängige Verringerung der freien *P.-gingivalis*-Keime festgestellt werden. Bei 10 % Serum belief sich die Abnahme nach 6 Stunden auf 34 % und nach 18 Stunden auf 90 %. Über den gesamten Versuchszeitraum konnte bei *A. actinomycetemcomitans* keine Veränderung registriert werden.

Die Vorinkubation der Keime selbst zeigte wenig Veränderung. Einzig *P. gingivalis* zeigte nach 18 Stunden bei mittleren Serumkonzentrationen eine leichte Zunahme.

Bei gleichzeitiger Infektion und Serumzugabe konnte bei *P. gingivalis* keine Veränderung beobachtet werden. *A. actinomycetemcomitans* zeigte über die ganze Versuchsdauer eine leichte, tendenzielle Zunahme. Nach 18 Stunden wurde im Vergleich zur Kontrolle die doppelte Anzahl freier Keime gezählt (vgl. Abb. 7 und Tab 10. im Anhang).

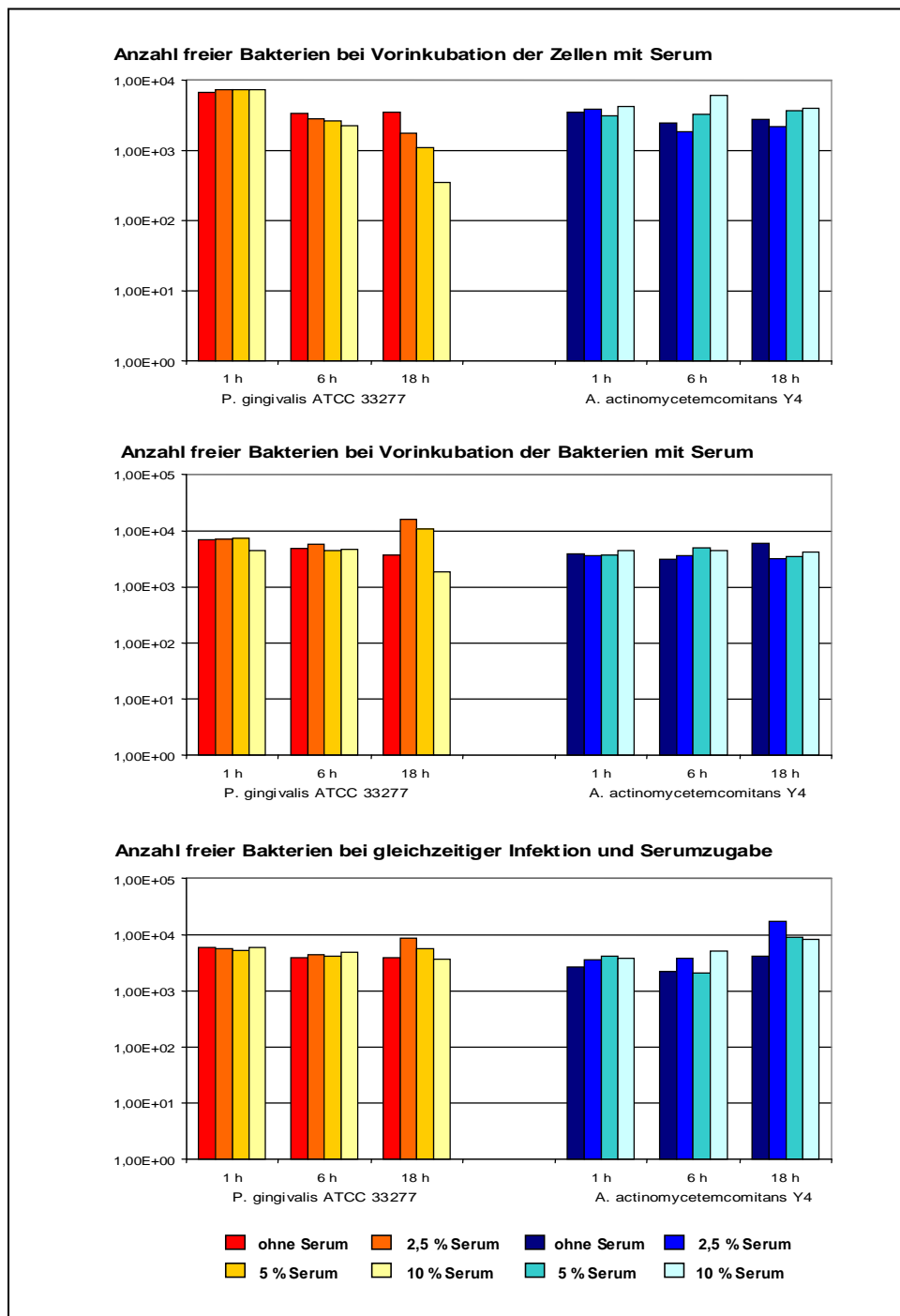


Abb. 7  
 KBE frei vorkommender Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 unter Einfluss von Serum im Zusammenhang mit Fibroblasten

## **Einfluss von Patientenserum auf *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 bei Fibroblasten**

Wurde für die Versuche Patientenserum verwendet, so konnte erst nach einer Versuchsdauer von 18 Stunden eine Veränderung der freien Keime bemerkt werden.

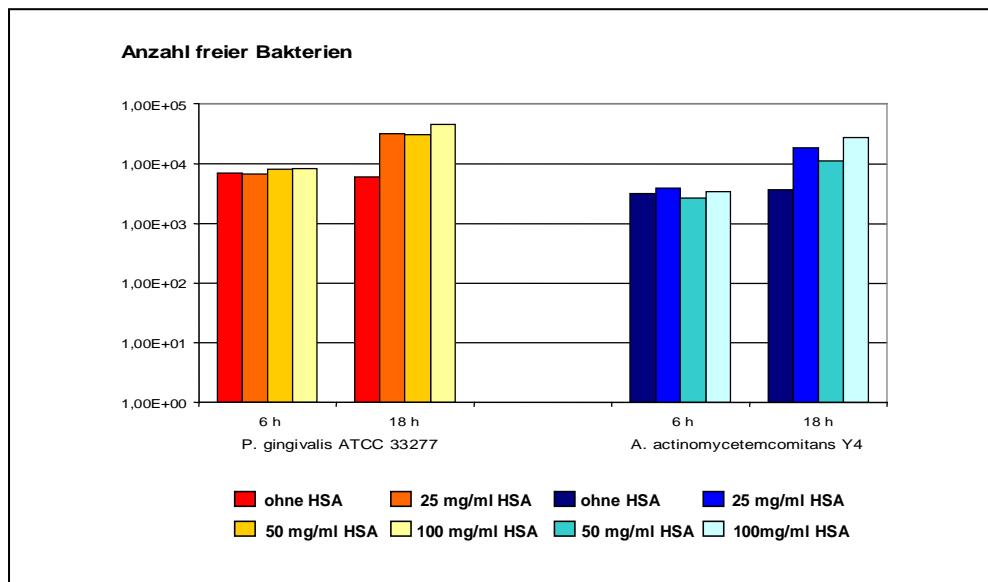


Abb. 8

KBE freier Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von Patientenserum bei Fibroblasten

Es kam bei *P. gingivalis* zu einer dosisabhängigen Steigerung der im Nährmedium verfügbaren Keime um das 7,6fache bei 10 % Serum. Bei *A. actinomycetemcomitans* kam es zu einer Zunahme um das 7,1fache bei 10 % Serumzusatz (vgl. Abb. 8 und Tab. 11 im Anhang).

## **Einfluss von humanem Serumalbumin auf *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 bei Fibroblasten**

HSA als Zusatz zeigte dagegen nach 6 Stunden keine Veränderung. *P. gingivalis* konnte im Durchschnitt mit 3845 KBE und *A. actinomycetemcomitans* mit 3972 KBE nachgewiesen werden (vgl. Abb. 9 und Tab. 12 im Anhang).

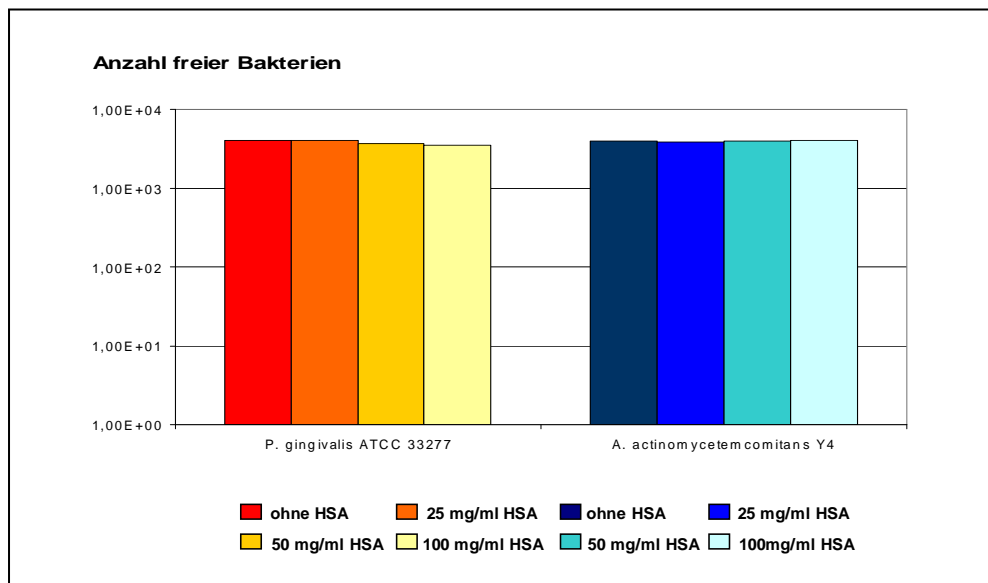


Abb.9  
KBE freier Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von HSA bei Fibroblasten

### 5.3 Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei KB-Zellen

#### 5.3.1 Einfluss von Serum auf die Ausschüttung von IL-6 zu verschiedenen Infektionszeitpunkten

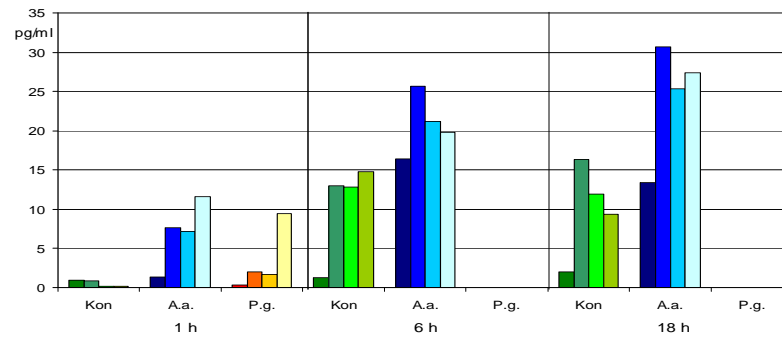
Wurden die Zellen vorinkubiert und anschließend durch *P. gingivalis* infiziert, konnte nach nur 1 Stunde eine Freisetzung von IL-6 nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Kontrolle wurden bei 10 % Serum 9,1 pg/ml mehr IL-6 freigegeben. Zur gleichen Zeit wurde bei *A. actinomycetemcomitans* und 10 % Serum ein IL-6-Spiegel von 11,6 pg/ml gemessen. Nach 6 und 18 Stunden konnte auch ohne Infektion eine serumabhängige Ausschüttung von IL-6 gezeigt werden. Im Vergleich zur serumfreien Probe wurden 13,5 pg/ml mehr IL-6 freigesetzt.

Bei Vorinkubation konnte IL-6 in nennenswerten Mengen nur nach Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* nachgewiesen werden. Der Höchstwert lag bei 29 pg/ml nach 6 Stunden.

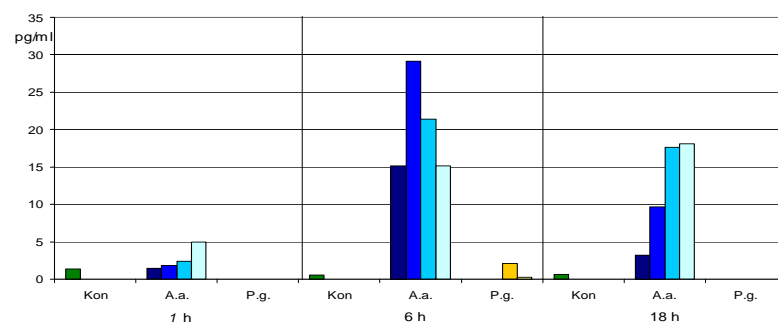
Erfolgte die Serumzugabe gleichzeitig mit der Infektion, konnte nach 6 und 18 Stunden eine deutliche Zunahme der IL-6-Freisetzung bei den Kontrollen und den infizierten Zellen gezeigt werden. Die größten Werte konnten nach 6 Stunden gemessen werden. Im Vergleich zu den serumfreien Proben stieg bei 5 % Serumzugabe die IL-6-Freisetzung auch nicht infizierter Zellen um das 40fache an, Zellen, die mit *P. gingivalis* infiziert wurden, setzten die 43fache (10 % Serum) Menge und die Zellen, die durch *A. actinomycetemcomitans* infiziert wurden, das 1,5fache (10 % Serum) frei (vgl. Abb. 10 und Tab. 13 im Anhang).



### IL-6-Freisetzung nach Vorinkubation der Zellen mit Serum



### IL-6-Freisetzung nach Vorinkubation der Bakterien mit Serum



### IL-6-Freisetzung bei gleichzeitiger Infektion und Serumzugabe

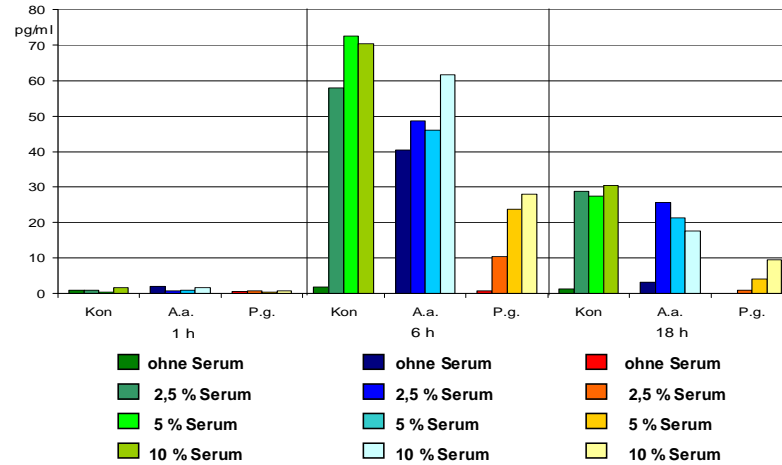


Abb. 10  
Freisetzung von IL-6 nach Vorinkubation oder gleichzeitiger Infektion bei KB-Zellen

### 5.3.2 Einfluss von Serum auf die Ausschüttung von IL-8 zu verschiedenen Infektionszeitpunkten

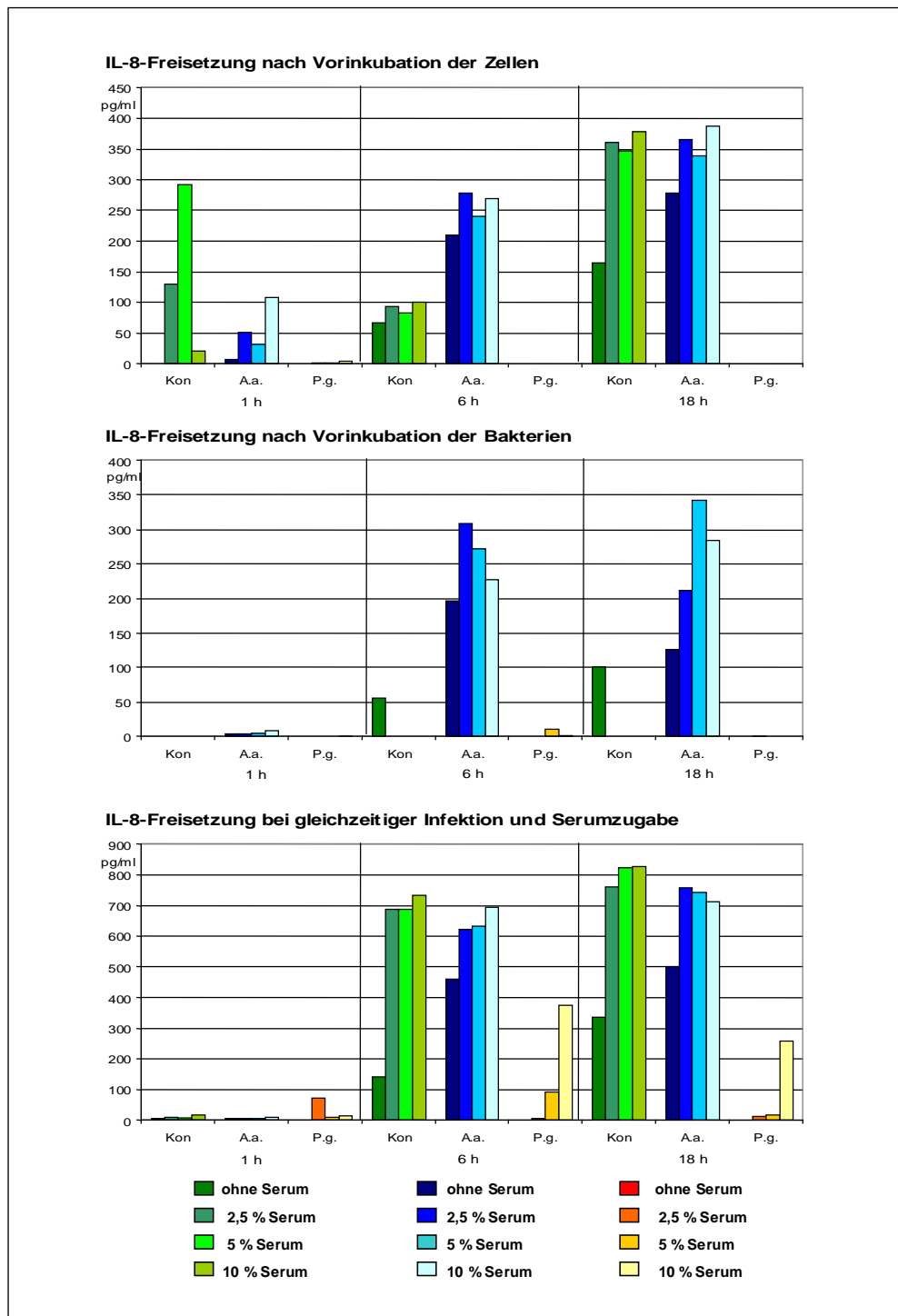


Abb. 11:  
Freisetzung von IL-8 nach Vorinkubation oder gleichzeitiger Infektion bei KB-Zellen

Die Vorinkubation der Zellen ergab bei Infektion durch *P. gingivalis* keine Ausschüttung von IL-8. Der Anstieg bei den mit *A. actinomycetemcomitans* infizierten Zellen belief sich jeweils bei höchster Serumkonzentration auf das 15fache (nach 1 Stunde), das 1,2fache (nach 6 Stunden) und das 1,4fache (nach 18 Stunden). Bei den nichtinfizierten Kontrollen ergab sich ebenfalls ein Anstieg bei allen serumhaltigen Proben um durchschnittlich 197pg/ml.

Die Freisetzung von IL-8 bei Vorinkubation der Bakterien lag bei den serumhaltigen Kontrollen und den von *P. gingivalis* infizierten Keimen unter der Nachweisgrenze. Nach 18 Stunden konnte bei *A. actinomycetemcomitans* eine gesteigerte IL-8-Freisetzung bei 5 % Serumzusatz beobachtet werden. Mit einem Serumzusatz von 5 % wurde der Höchstwert von 342 pg/ml IL-8 erreicht.

Bei gleichzeitiger Infektion und Serumzugabe wurden deutlich größere Mengen an IL-8 freigesetzt als in den Versuchen mit zellulärer oder bakterieller Vorinkubation. Nach 6 und 18 Stunden ergab sich ein konzentrationsabhängiger Zuwachs bei *P. gingivalis* um 374 pg/ml (6 Stunden) und 258 pg/ml (18 Stunden) bei jeweils 10 % Serum. Im gleichen Zeitraum bewegte sich der Zuwachs bei *A. actinomycetemcomitans* um maximal 234 pg/ml bzw. 210 pg/ml. Die serumhaltigen, aber nicht infizierten Zellen erhöhten ihre Freisetzung von IL-8 gemittelt um das 4,9fache nach 6 Stunden und das 2,4fache nach 18 Stunden (vgl. Abb. 11 und Tab 14 im Anhang).

### **5.3.3 Einfluss von Patientenserum auf die Ausschüttung von IL-6 und IL-8**

In diesen Versuchsreihen erfolgte die Infektion zum selben Zeitpunkt wie die Serumzugabe. Durch *P. gingivalis* und Patientenserum konnten keine wesentlichen Mengen IL-6 freigesetzt werden. Nach 18 Stunden bewegten sich die Mengen im Bereich der Nachweisgrenze. Die stärkste Freisetzung wurde nach Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* nach 6 Stunden und 5 % Serumzusatz mit 18,5 pg/ml erreicht. Die serumhaltigen Kontrollen beinhalteten durchschnittlich 15,8 pg/ml (vgl. Abb. 12 und Tab. 15 im Anhang).

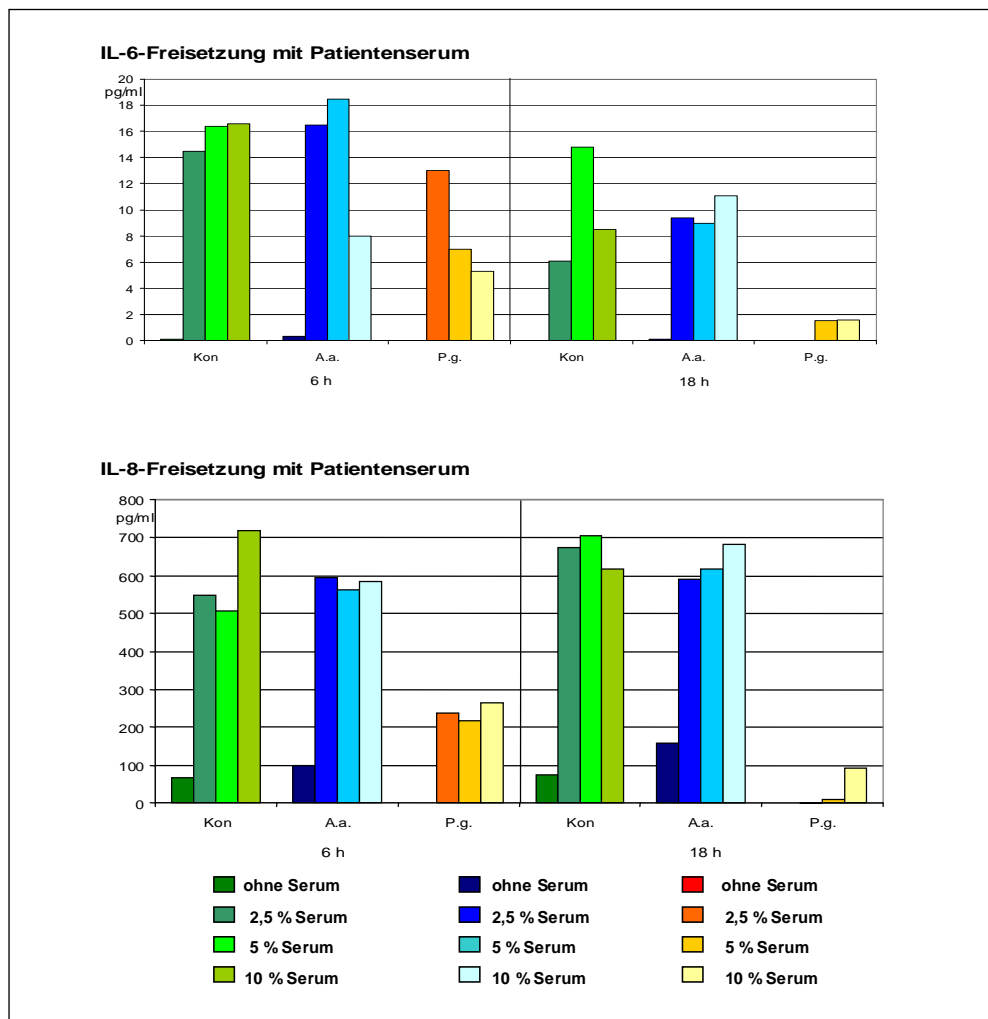


Abb. 12 oben  
Freisetzung von IL-6 bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von Patientenserum bei KB-Zellen

Abb. 12 unten  
Freisetzung von IL-8 bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von Patientenserum bei KB-Zellen

Nach 6 Stunden Inkubationszeit wurden bei den mit *P. gingivalis* infizierten Zellen und 10 % Serumzusatz im Mittel 240 pg/ml IL-8 freigesetzt. Bei *A. actinomycetemcomitans* konnte im Vergleich zur serumfreien Kontrolle gemittelt 581 pg/ml nach 6 Stunden bzw. 630 pg/ml nach 18 Stunden gemessen werden. Das entspricht einem Zuwachs um das 5,8fache bzw. um das 3,9fache. Bei den nicht infizierten Proben wurde nach 6 Stunden und 10 % Serum der höchste Wert mit 718 pg/ml IL-8 nachgewiesen und stellt einen Anstieg um das 10,8fache dar (vgl. Abb. 12 und Tab. 16 im Anhang).

## 5.4 Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei Fibroblasten

### 5.4.1 Einfluss von Serum auf die IL-6 Ausschüttung zu verschiedenen Infektionszeitpunkten

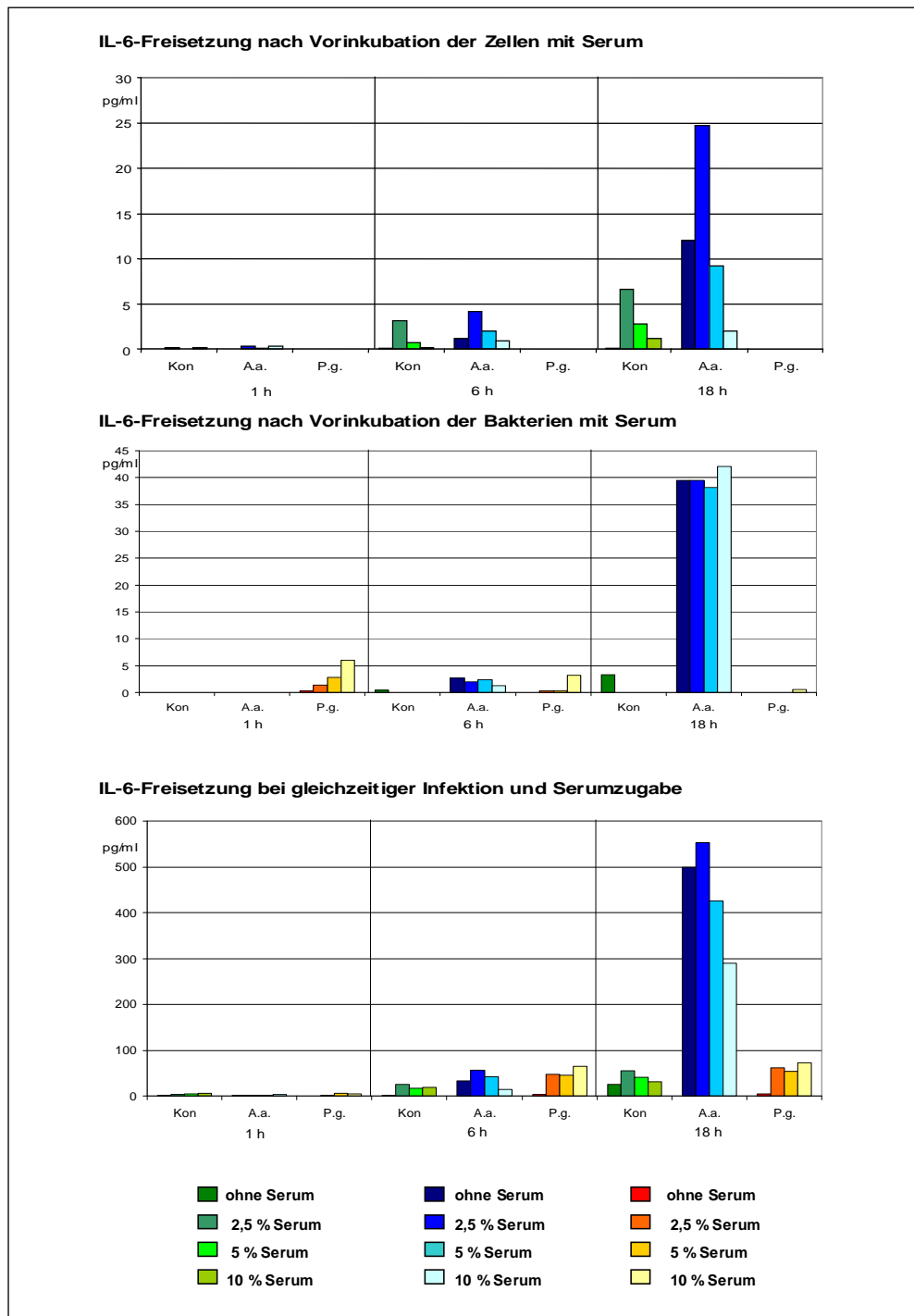


Abb. 13  
Freisetzung von IL-6 nach Vorinkubation oder gleichzeitiger Infektion bei Fibroblasten

Fibroblasten waren nach ihrer Vorinkubation und anschließender Infektion nicht in der Lage, IL-6 in größeren Mengen auszuschütten. Einzig nach der Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* konnte nach 18 h verstärkt IL-6 nachgewiesen werden.

Bei Vorinkubation der Keime konnte eine größere Menge dieses Interleukins wiederum nur bei *A. actinomycetemcomitans* nachgewiesen werden. Allerdings konnte keine Abhängigkeit durch Serum festgestellt werden. Die größte Menge, die durch *P. gingivalis* ausgeschüttet wurde, konnte nach 1 Stunde und 10 % Serumzusatz verzeichnet werden (6 pg/ml).

Mit gleichzeitiger Infektion konnte nach 6 und 18 Stunden IL-6 bei *P. gingivalis* gemessen werden. Mit 10 % Serumzusatz wurde nach 6 Stunden ein Anstieg um das 24fache bzw. nach 18 Stunden um das 15,6fache gemessen. Die größte Menge IL-6 konnte nach 18 Stunden bei *A. actinomycetemcomitans* und 2,5 % Serum nachgewiesen werden. Mit höherem Serumzusatz ging die Ausschüttung um 42 % zurück (vgl. Abb. 13 und Tab. 19 im Anhang).

#### **5.4.2 Einfluss von Serum auf die IL-8 Ausschüttung zu verschiedenen Infektionszeitpunkten**

Eine Freisetzung von IL-8 konnte bei Vorinkubation der Fibroblasten mit Serum nur bei *A. actinomycetemcomitans* gemessen werden. Sie belief sich im Mittel auf 608,5 pg/ml. Serumabhängige Unterschiede wurden nicht festgestellt. *P. gingivalis* konnte zu keinem Zeitpunkt eine Interleukinantwort hervorrufen.

Bei Vorinkubation der Keime war nur *A. actinomycetemcomitans* in der Lage, eine Freisetzung von IL-8 zu provozieren. Die freigesetzten Mengen sanken jedoch mit Serumzusatz um 56,7 % bei 5 % Serumzusatz.

Mit synchroner Infektion konnte *P. gingivalis* bei höchster Serumkonzentration und einer Versuchsdauer von 6–18 Stunden eine um das 70fache (6 Stunden) bzw. um das 40,2fache (18 Stunden) gesteigerte IL-8-Freisetzung hervorrufen.

*A. actinomycetemcomitans* setzte bei 5 % Serum 689 pg/ml IL-8 frei. Bei den nicht infizierten Zellen konnte ein Zuwachs um das 6,8fache bei 5 % Serum und einer Versuchsdauer von 18 Stunden gemessen werden (vgl. Abb. 14 und Tab. 20 im Anhang).

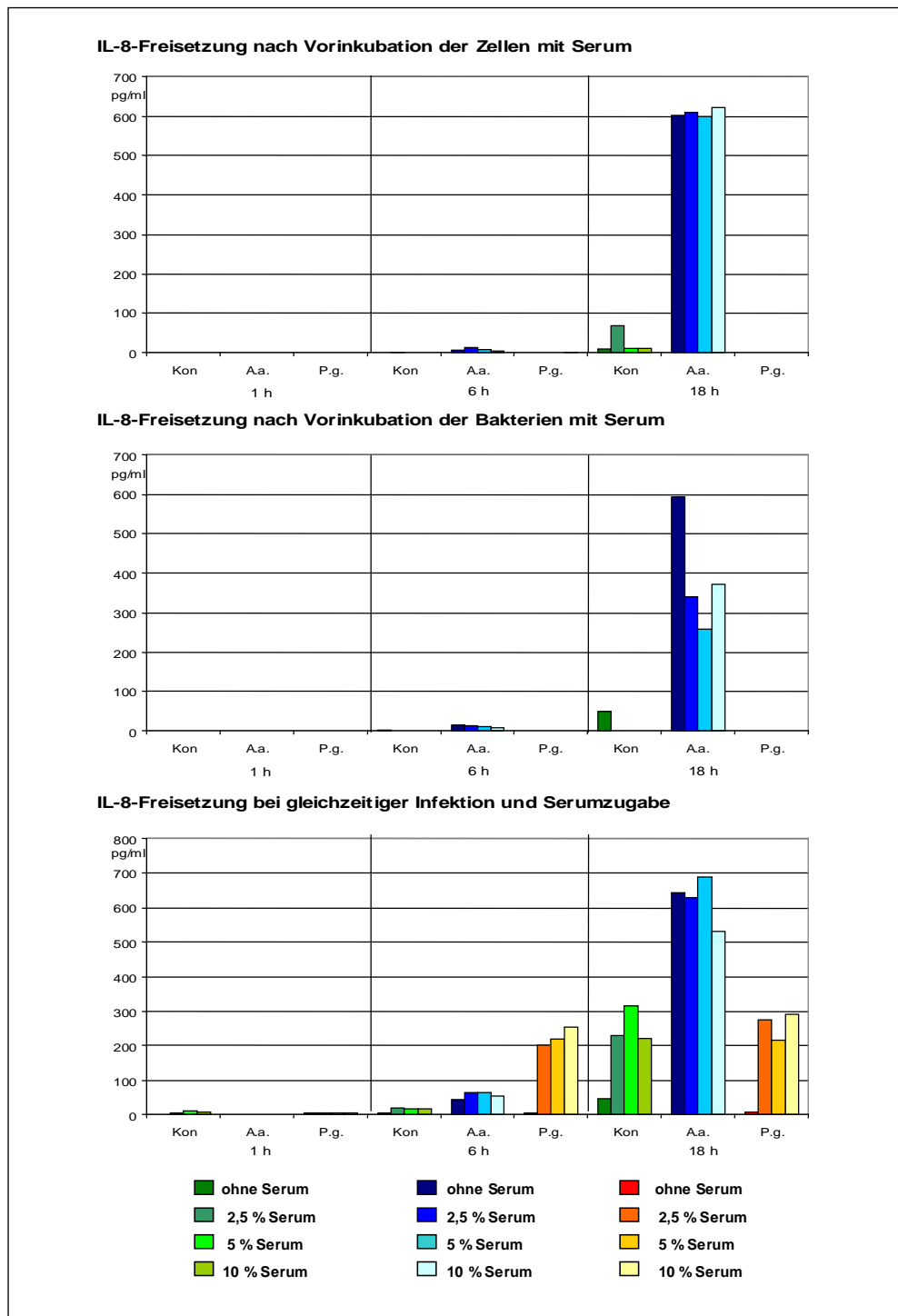


Abb. 14  
Freisetzung von IL-8 nach Vorinkubation oder gleichzeitiger Infektion bei Fibroblasten

### 5.4.3 Einfluss von Patientenserum auf die Ausschüttung von IL-6 und IL-8

Bei gleichzeitiger Infektion konnte *P. gingivalis* mit einem Serumzusatz von 2,5 % die größte Menge IL-6 (58 pg/ml) bei den Zellen freisetzen. Mit steigender Serumkonzentration fiel die freigesetzte Menge IL-6 auf 12 pg/ml bei 10 % Serumzusatz. *A. actinomycetemcomitans* zeigte mit 2,5 % Serumzusatz die stärkste Reaktion. Mit gesteigertem Serumzusatz fielen die Werte, bezogen auf den Maximalwert, auf 16,8 % (6 Stunden) und 36,5 % (18 Stunden). Die Kontrollen zeigten sich ebenfalls schwach positiv. IL-8 konnte durch *P. gingivalis* ebenfalls bei Fibroblasten freigesetzt werden. Die größte Menge

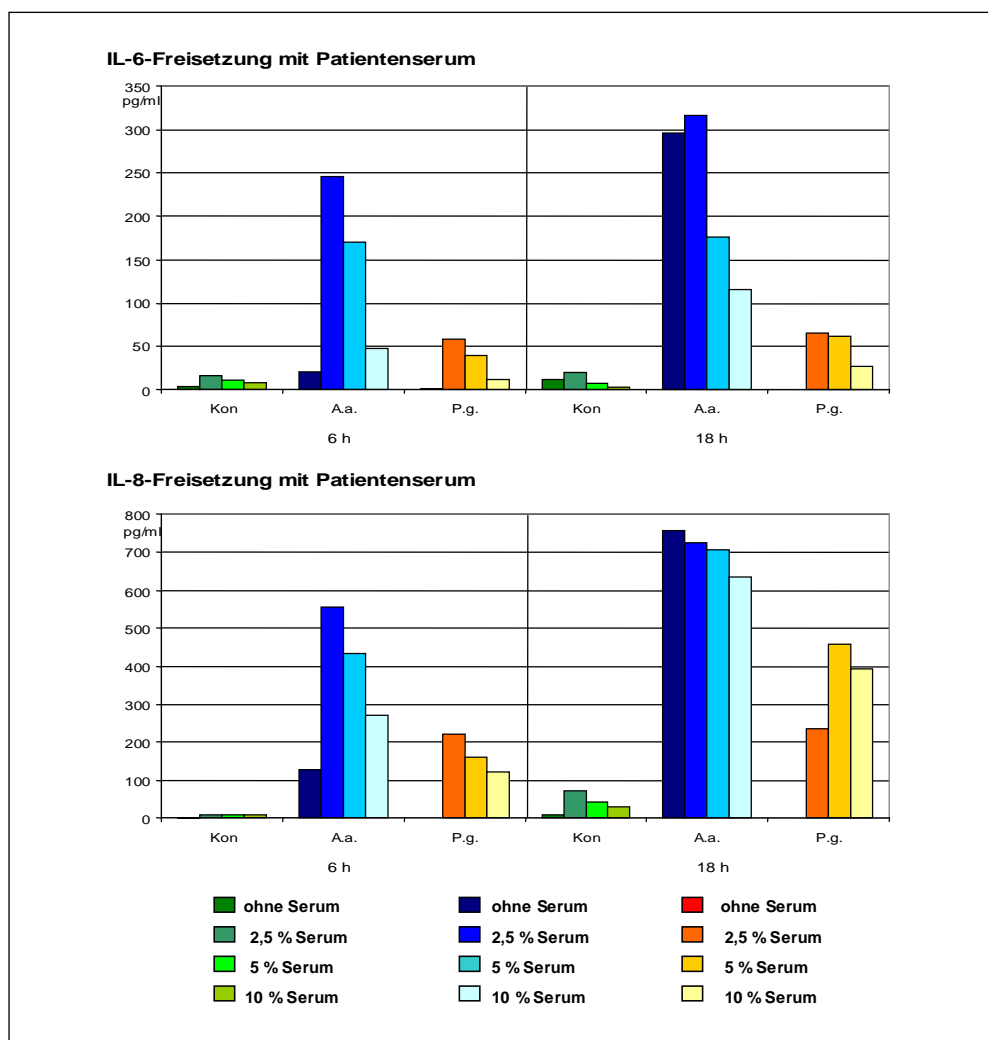


Abb. 15  
Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von Patientenserum bei Fibroblasten



wurde nach 18 Stunden und einem Serumzusatz von 5 % gemessen und betrug 393 pg/ml. *A. actinomycetemcomitans* zeigte, bezogen auf die serumfreie Kontrolle, nach 6 Stunden und 2,5 % Zusatz die stärkste Wirkung. Es wurde ein Anstieg um das 4,3fache festgestellt. Nach 18 Stunden sank die Freisetzung um 16,12 %. Die Kontrollen zeigten nach 18 Stunden und einem Zusatz von 2,5 % mit 73,3 pg/ml die stärkste Reaktion im Versuch (vgl. Abb. 15 und Tab. 21 u. 22 im Anhang).

#### **5.4.4 Einfluss von humanem Serumalbumin auf die Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei KB-Zellen und Fibroblasten**

##### **KB-Zellen**

Konzentrationsabhängig wurde durch HSA die freigesetzte Menge von IL-6 erhöht. Bei den Proben, die durch *P. gingivalis* infiziert wurden, konnte schon bei Zugabe von 50 mg/ml HSA die größte Menge IL-6 mit 214 pg/ml gemessen werden. *A. actinomycetemcomitans* erreichte im Vergleich zur serumfreien Kontrolle einen 26,6fachen Anstieg bei Zugabe von 50 mg/ml HSA. Bei den nicht infizierten Proben wurde die größte Menge IL-6 bei höchster HSA-Konzentration von 100 mg/ml gemessen.

Mit 50 mg/ml wurden bei *P. gingivalis* 1,9 ng/ml IL-8 freigesetzt. Bei *A. actinomycetemcomitans* konnte ein Zuwachs um das 5,3fache gemessen werden (bei 50 mg/ml HSA-Zusatz). Die nicht infizierten Zellen erreichten bei höchster HSA-Konzentration den größten Anstieg von IL-8. Dabei handelte es sich um einen Zuwachs um das 11,2fache (vgl. Abb. 16 und Tab. 17 u. 18 im Anhang).

##### **Fibroblasten**

*P. gingivalis* konnte bei Zusatz von 50 mg/ml HSA 73,8 pg/ml IL-6 bei Fibroblasten freisetzen. Dies entspricht verglichen mit der serumfreien Probe einem Zuwachs um das 26,3fache. *A. actinomycetemcomitans* konnte mit der gleichen HSA-Konzentration die höchste Menge an IL-6 (52,3 pg/ml) aus den

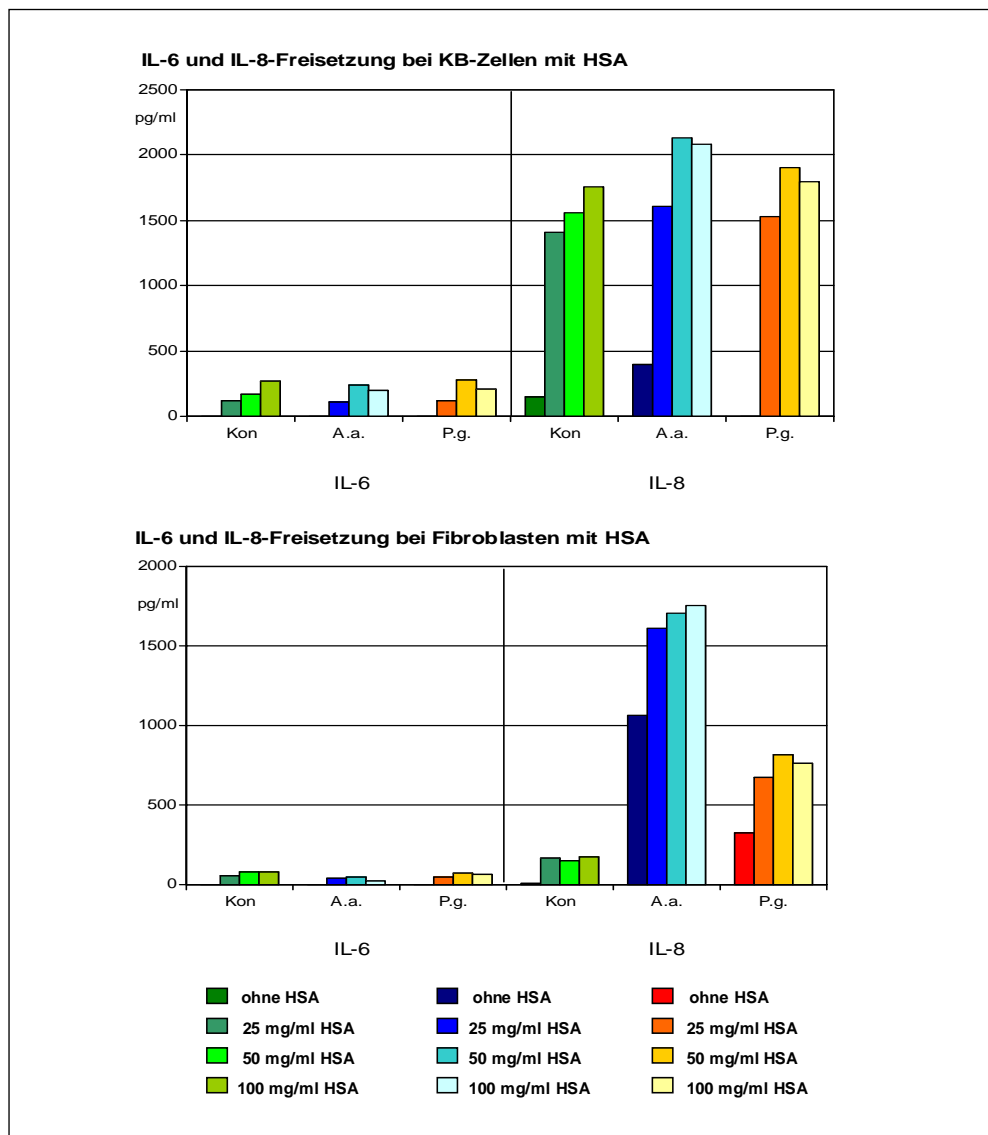


Abb. 16  
Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von HSA bei KB-Zellen und Fibroblasten nach 6 h

Zellen freisetzen. Die nicht infizierten Zellen konnten mit HSA durchschnittlich 73,9 pg/ml IL-6 (HSA-Zusatz gemittelt) ausschütten. Zur HSA-freien Probe entspricht dies einem Anstieg um das 20fache. Bei den durch *P. gingivalis* infizierten Fibroblasten konnte bei 50 mg/ml HSA die größte Menge IL-8 (820 pg/ml) gemessen werden. Dosisabhängig erreichte *A. actinomycetemcomitans* bei höchster HSA-Konzentration die größte Freisetzung von IL-8 von 1,7 ng/ml. Das entspricht einem Anstieg um 164,4 %. Die nicht infizierten Zellen verzeichneten bei durchschnittlicher Zugabe von HSA eine IL-8-Freisetzung von

168,5 pg/ml. Verglichen mit der Kontrolle entspricht das einem Anstieg um das 13,6fache (vgl. Abb. 16 und Tab. 23 u. 24 im Anhang).

## **6 Diskussion**

Die Pathogenese von Parodontitiden ist ein komplexer Vorgang, der aus unterschiedlichen Komponenten wie u. a. bakterieller Besiedelung mit bestimmten pathogenen Keimen, sub- bzw. supragingivaler Plaqueakkumulation und Wirtsabwehr besteht. Für die Destruktion sind neben bakteriell eingeleiteten Prozessen vor allem auch fehlgeleitete immunologische Interaktionen mit dem parodontalen Gewebe verantwortlich (Offenbacher 1996).

In dieser In-vitro-Studie wurde der Einfluss von Serum auf die Keimzahlen von *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* auf KB-Zellen und Fibroblasten untersucht. Weiterhin wurde nach Infektion der Zellen mit diesen Keimen die Zytokinantwort (IL-6 und IL-8) in Abhängigkeit von der Serumkonzentration bzw. der Albuminkonzentration kontrolliert. Über die Freisetzung von Interleukinen bei infizierten Zellen gibt es verschiedene Publikationen (Fletcher et al. 1997, Steffen et al. 2000, Sandros et al. 2000). Jedoch sind in diesem Zusammenhang kaum Studien mit Serum oder Albumin zu finden.

### **6.1 Methodik**

Als Vorbild für die Mundschleimhaut wurden für die Versuche KB-Zellen und Gingivafibroblasten verwendet. Die Zelllinie der immortalisierten KB-Zellen stammt aus einem humanen Epidermoidkarzinom. Eine permanente Zelllinie wie KB-Zellen sorgt für vergleichbare Versuchsbedingungen und für reproduzierbare Ergebnisse, weshalb sie auch bei ähnlichen Versuchen herangezogen wurden (Duncan et al. 1993 und Yumoto et al. 1999). Für die schematische Darstellung von tiefer liegenden Gewebsschichten wurden in separaten Versuchen humane Gingivafibroblasten benutzt. Sie stammten von der Wurzeloberfläche eines extrahierten Seitenzahns. Für gleich bleibende Bedingungen wurden beide Zelllinien in niedriger Passage in den Versuchen verwendet. KB-Zellen und Gingivafibroblasten wurden in dieser Studie jeweils separat in einem Monolayer kultiviert und in die Versuchsanordnung eingebracht. Somit kann diese Versuchsanordnung nur als vereinfachtes Modell

der oralen Gegebenheiten des Parodonts angesehen werden. Weiterhin sind in vivo die verwendeten Zellen nie isoliert anzutreffen. Sie kommen mehrschichtig im Schleimhautepithel oder mit anderen Zellen im Bindegewebe mit freien Bindegewebszellen, wie z. B. Abwehrzellen, vor.

KB-Zellen weisen weiterhin in ihrer Oberflächenbeschaffenheit Unterschiede zu Epithelzellen auf und besitzen somit etwas veränderte Rezeptoreigenschaften. Sandros und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass KB-Zellen eine niedrigere Rezeptorendichte auf ihrer Oberfläche aufweisen als Zellen des Taschenepithels. Somit ist ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten der ausgewählten Keime zu berücksichtigen (Sandros et al. 1994).

Bei Vergleichen mit Primärkulturen aus dem Taschenepithel konnte gezeigt werden, dass die Zytokinreaktion nach Infektion mit *P. gingivalis* und *Escherichia coli* ähnlich derjenigen der KB-Zellen war (Sandros et al. 2000).

Als parodontopathogene Keime wurden *P. gingivalis* ATCC 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 ausgewählt, die als Referenzstämme schon in vielen Versuchen benutzt wurden. *P. gingivalis* ist in der Lage, mit seinen Fimbrien spezifisch an Oberflächenrezeptoren von Epithelzellen und Fibroblasten anzudocken, in Epithelzellen einzudringen und in den Stoffwechsel einzugreifen. In verschiedenen anderen Studien wurde eine Interleukinantwort von KB-Zellen und Fibroblasten nach Infektion mit *P. gingivalis* festgestellt (Steffen et al. 2000 und Loubakos et al. 2001). Auch *A. actinomycetemcomitans* ist in der Lage, sich an KB-Zellen und Fibroblasten zu binden und in den Stoffwechsel der Zelle einzugreifen. Die Expression von Interleukinen bei KB-Zellen und Fibroblasten nach einer Infektion wurde in mehreren Studien belegt (Takayama et al. 2003 und Sfakianakis et al. 2001). Vergleiche mit verschiedenen Stämmen einer Spezies zeigen, dass Virulenzfaktoren stark variieren und somit auch Untersuchungsergebnisse verändern können (Eick et al. 2002).

Bei parodontopathogenen Vorgängen stellt der Sulkus mit der Sulkusflüssigkeit einen zentralen Ort der Wirtsabwehr dar. Die Sulkusflüssigkeit ist Teil der Abwehr, da sie notwendige Bestandteile des Immunsystems transportiert. Diese gleichen in ihrer Zusammensetzung den im Blutserum vorkommenden immunkompetenten Systemen (Ebersole 2003). Da es äußerst schwierig ist, Sulkusflüssigkeit in einer ausreichenden Menge und in einer gleich bleibenden Qualität für vergleichbare Resultate aus dem Sulkus zu gewinnen, wurde gepooltes Serum gesunder Probanden (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) für einen Großteil der Versuchsreihen benutzt. Bei einer weitergehenden Versuchsreihe wurde Serum von einem Patienten mit einer parodontalen Mischinfektion (*P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans*) gewonnen. Da in der Zusammensetzung von Serum und Sulkusflüssigkeit dennoch Unterschiede auftreten können, wie z.B. das Fehlen zellulärer Bestandteile im Serum, sind gewisse Abweichungen in der Versuchsanordnung im Voraus nicht ausgeschlossen. Versuche mit Sulkusflüssigkeit einer definierten Probandengruppe könnten die Ergebnisse verifizieren.

## **6.2 Adhäsion und Invasion von *P. gingivalis* ATCC 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 bei KB-Zellen**

### ***Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277**

Die Fähigkeit der Keime *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans*, an Epithelzellen zu adhären, stellt einen wichtigen Schritt in der Pathogenese von Parodontopathien dar. Mit der nachfolgenden Internalisierung entziehen sie sich der Körperabwehr. Die wichtigste Komponente bei der Adhäsion von *P. gingivalis* stellen die Fimbrien dar, welche sich aus Untereinheiten von Fimbrillin zusammensetzen. Sie werden von einem einzigen Gen (FimA-Gen) kodiert und zeigen keine signifikante Ähnlichkeit zu Fimbrien anderer Bakterien (Dickinson et al. 1988). Für die sich anschließende Invasion bei KB-Zellen scheint der Kontakt der Fimbrien zu verwandten Oberflächenstrukturen wie den  $\beta$ 1-Integrinen maßgeblich zu sein. Durch diese Verbindung kommt es intrazellulär zu verschiedenen Veränderungen, die für eine Invasion notwendig erscheinen, wie einer Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und einer Modulation der MAP-Kinase.

Im Bereich des adhärenenten Bakteriums strukturiert sich das Cytoskelett um und bereitet die Aufnahme in die Zelle vor (Lamont und Jenkinson 1998, Izutsu et al. 1996). Nach der Invasion kann das Bakterium vorwiegend in der Nähe des Zellkerns nachgewiesen werden (Belton et al. 1999).

Bei unseren Versuchen zeigte sich in der Versuchsreihe mit simultaner Infektion nach 1 Stunde eine deutliche, serumabhängige Hemmung der Invasion. Mit weiterer Versuchsdauer setzte sich diese Hemmung nicht fort. So konnte bei mittlerer Serumkonzentration (5 %) sogar ein leichter Anstieg um 5,5 % der invasiven Keime nach 18 Stunden im Vergleich zur serumfreien Kontrollgruppe festgestellt werden. Die anfängliche Hemmung der Invasion kann auch einer Veränderung im Adhäsionsverhalten geschuldet sein. In Abhängigkeit von Serum wurde dies von Xie und seinen Mitarbeitern festgestellt. Sie untersuchten mit Hilfe eines speziellen FimA-Gen-Promoters und einer spektrometrischen  $\beta$ -Galaktosidase-Assay die Aktivität der Genexpression. In ihren Versuchen stellten sie fest, dass die Aktivität des FimA-Gens mit 5 % gepoolten Humanserum einen Rückgang der Genaktivität um über 60 % im Vergleich zu den Kontrollen bewirkte (Xie et al. 1997).

In unseren Versuchen mit Patientenserum zeigte sich ein Rückgang der adhärenenten Keime um 20 % bei höchster Serumkonzentration. Somit scheinen Moleküle im Serum fähig zu sein, die Expression von Fimbrien hemmen zu können (Xie et al. 1997).

Weiterhin konnten unsere Versuche zeigen, dass humanes Serumalbumin (HSA) an diesem Hemmmechanismus beteiligt ist. In der Versuchsreihe mit HSA konnten im Vergleich zur Kontrolle die adhärenenten Keime auf 12 % reduziert werden. Die Anzahl der internalisierten Keime ging auf 17 % zurück.

In den Versuchen mit Vorinkubation der Bakterien mit verschiedenen Serumkonzentrationen zeigten sich nach einer Stunde nur geringe serumabhängige Unterschiede im Adhäsions- bzw. Internalisierungsverhalten. Eine andere Studie beschreibt nach 60 min Vorinkubationszeit eine Hemmung

der Invasion. Bei einer Verdünnung des Serums von 1:100 und größer ging der protektive Effekt des Serums verloren. Allerdings wurden diese Versuche mit Gingivaepithelzellen durchgeführt (Lamont et al. 1995). Mit längerer Versuchsdauer konnte eine steigende Anzahl von adhärenenten und internalisierten Keimen festgestellt werden. Die höchste Zahl adhärenenten Keime konnte mit 136.000 KBE nach 6 Stunden bei einer Serumkonzentration von 5 % festgestellt werden. Dies war eine bedeutende Steigerung im Vergleich zur Kontrolle mit 2400 KBE. Einen ähnlichen Anstieg konnten wir bei den internalisierten Keimen feststellen, wo ebenfalls nach 6 Stunden, aber mit 10 % Serumzusatz die höchsten Werte erreicht wurden. Somit scheint es Effekte bei dieser Wechselwirkung zwischen Bakterienzelle und Wirtszelle zu geben, bei denen Serum oder Serumbestandteile sich zum einen hemmend und zum anderen auch fördernd auswirken.

Die frei vorkommenden Bakterien im Nährmedium zeigten nach 6 und 18 Stunden eine serumabhängige Zunahme der Höchstwerte mit 10 % Serum. Bei Vorinkubation der Zellen konnte ebenfalls eine Zunahme der freien Bakterien nach 1 Stunde und nach 6 Stunden bei mittleren Serumkonzentrationen verzeichnet werden. Bei Vorinkubation der Bakterien wurden die meisten freien Keime nach 6 Stunden und 10 % Serum detektiert. Mit 25 mg/ml Albumin erreichte das Wachstum bei unseren Versuchen sein Maximum. Es konnte gezeigt werden, dass *P. gingivalis* ATCC 33277 in einem Nährmedium, dem markiertes Albumin zugesetzt war, sich ausgezeichnet vermehren konnte, so dass die optische Dichte von einem Ausgangswert von ca. 0,05 auf fast 1,0 bei 660 nm anstieg. Die markierten Bruchstücke des Albumins konnten intrazellulär nachgewiesen werden. Als verantwortliche Protease konnte Arg-Gingipain festgestellt werden. *P.-gingivalis*-Mutanten, denen diese Protease fehlte, konnten sich unter diesen Bedingungen nicht vermehren (Grenier et al. 2001). Dies belegt, dass durch die Zugabe von Serum extrazellulär Bedingungen geschaffen wurden, die für das Wachstum von *P. gingivalis* förderlich sind. Somit kann die Anwesenheit von Sulkusflüssigkeit und ihren Proteinen durch die Vergärung von Aminosäuren als Energielieferant angesehen werden. *P.*



gingivalis ist dafür mit einem reichhaltigen Arsenal an Proteinasen und Peptidasen ausgestattet.

#### **Actinobacillus actinomycetemcomitans Y4**

Als Schlüsselkeim bei aggressiven Formen der Parodontitis, die u.a. mit starkem Knochenverlust assoziiert sind, wird der gramnegative Actinobacillus actinomycetemcomitans angesehen. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass A. actinomycetemcomitans Y4 an KB-Zellen adhären und internalisieren kann. In unseren Versuchen konnten wir dies bestätigen. Einleitend für den Prozess der Invasion scheint der primäre Kontakt zu den Mikrovilli der Zelle und dem zellulären Transferrinrezeptor zu sein (Meyer et al. 1997). Zusätzlich kommen für einen anderen Eintritt in die Zelle auch die Integrine, ähnlich wie bei P. gingivalis, in Betracht (Fives-Taylor et al. 1999). Durch die Bindung an Rezeptoren der Wirtszelle werden noch unbekannte Signale an die Zelle weitergegeben. Daraufhin kommt es zu einer Umformierung des Zytoskeletts und die Aktinfilamente lagern sich verstärkt in der Umgebung des adhärenen Bakteriums am Zellinneren an. Die Zellwand stülpt sich ein, der Keim wird umschlossen und durch eine Endozytose in die Zelle aufgenommen (Lamont 2002). Neben diesem aktinabhängigen Aufnahmeprozess wird ein weiterer, aktinunabhängiger Weg in die Zelle beschrieben (Brissette und Fives-Taylor 1999).

In unseren Versuchsaufbauten bei gleichzeitiger Infektion und den Versuchen mit Vorinkubation (zellulär bzw. bakteriell) konnten wir generell mit längerer Versuchsdauer einen Anstieg der adhärenen Keime bei den Kontrollen beobachten. Bei den unterschiedlichen Serumkonzentrationen konnte kein einheitliches Bild gezeigt werden. Tendenziell konnte bei gleichzeitiger Infektion eine leichte Zunahme der adhärenen Keime bei 2,5 % und 5 % Serumzusatz gezeigt werden. Bei Vorinkubation der Zellen wurde bei hoher Konzentration der Serumzugabe eher ein Rückgang deutlich. Wurden die Keime vorinkubiert, kam es erst nach 18 Stunden zu einer serumabhängigen Steigerung um gemittelt 28 % der Adhäsion im Vergleich zur Kontrolle. Bei gleichzeitiger

Infektion mit Patientenserum war nach 6 Stunden kein Unterschied zur Kontrolle feststellbar.

Die insgesamt schwache Reaktion auf Serum könnte auf eine Resistenz gegenüber dem Komplement erklärt werden. Auf der Oberfläche von *A. actinomycetemcomitans* Y4 konnte ein Protein mit einem ungefähren Molekulargewicht von 100 kDa identifiziert werden. Aufgrund dieses Proteins (Omp 100) konnte eine fast vollständige Resistenz gegenüber Serum nachgewiesen werden. Der Mechanismus dieser Resistenz liegt in der Fähigkeit, Faktor H zu binden. Dadurch wird der Komplementfaktor C3b in eine inaktive Form überführt (Asakawa et al. 2003).

Weitere Versuche, die wir unternahmen, zeigten, dass das Albumin als Serumbestandteil ebenfalls eine gewichtige Rolle zu spielen scheint. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten die adhärenenten Keime bei einer HSA-Zugabe von 100 mg/ml auf 2,4 % nach 6 Stunden verringert werden. Weitere Studien, die diesen Mechanismus erklären, scheinen angezeigt.

Nach Adhäsion konnten die ersten Bakterien schon nach einer Stunde intrazellulär nachgewiesen werden. Dabei wurden im Mittel 2063 KBE nachgewiesen. Über die gesamte Versuchslänge konnte bei den Kontrollen in jedem Versuchsansatz ein Anstieg der internalisierten Keime festgestellt werden. Dies deckt sich mit anderen Untersuchungen und kann auf eine gesteigerte Zellteilungsrate zurückgeführt werden. Nach erfolgreicher Auflösung des Vesikels beginnt frei im Zytoplasma eine bis um 7,5fach gesteigerte Zellteilung. Weiterhin wurde beobachtet, dass *A. actinomycetemcomitans* die Fähigkeit besitzt, nach einer Invasion die Zelle zu verlassen bzw. über eine zelluläre Protrusion in benachbarte Zellen einzudringen (Meyer et al. 1996). Durch diese Dynamik kann unser Versuchsansatz nur zu den bestimmten Intervallen eine Aussage zu den freien, adhärenenten und internalisierten Keimen aufzeigen.

Bei den Versuchen mit Vorinkubation zeigte sich ein unterschiedliches Bild. Wurden die Zellen mit Serum vorinkubiert, zeigte sich bei 10 % Serumzusatz nach 6 und 18 Stunden eher eine Hemmung im Internalisierungsprozess. Bei bakterieller Vorinkubation zeigte sich nach 18 Stunden bei allen Serumkonzentrationen ein Anstieg der intrazellulären Keime.

Eine sinkende Zahl der internalisierten Bakterien bei HSA-Zusatz kann auf die reduzierte Anzahl der adhärenenten Keime zurückgeführt werden.

Abschließend muss festgestellt werden, dass im Detail die Mechanismen, die mit der Adhäsion und der Invasion in Zusammenhang stehen, noch zu einem großen Teil ungeklärt sind. Weitere Studien scheinen notwendig.

### **6.3 Interleukinfreisetzung**

#### **6.3.1 Interleukinfreisetzung bei KB-Zellen nach Infektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4**

Parodontopathogene Keime, wie z.B. *Eikenella corrodens*, können bei KB-Zellen das Absondern der Interleukine IL-6 und IL-8 bewirken (Yumoto et al. 1999). Teile von *P. gingivalis*, wie Fimbrien, LPS und Cysteinproteasen, können bei Makrophagen und neutrophilen Granulozyten die Freisetzung von verschiedenen Interleukinen, wie z.B. IL-6 und IL-8, anregen (Madianos et al. 1997 und Njoroge et al. 1997). Unsere Versuche zeigten, dass *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* in der Lage waren, eine Ausschüttung von IL-6 und IL-8 bei KB-Zellen hervorzurufen. Es zeigte sich aber auch, dass nicht infizierte KB-Zellen diese Interleukine freisetzen. Allerdings waren diese Mengen äußerst gering und bewegten sich im Bereich der Nachweisgrenze von 2 pg/ml. Bei den Versuchen mit gleichzeitiger Infektion zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang mit der zugeführten Serumkonzentration. Nach 6 und 18 Stunden stiegen die Werte der freigesetzten Interleukine mit steigendem Serumzusatz an. Wurden Zellen oder Bakterien vorinkubiert, konnte ein ähnlicher, aber abgeschwächter

Effekt beobachtet werden. Da bei *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* bei simultaner Infektion deutlich höhere Werte erzielt wurden, scheinen erst im gleichzeitigen Zusammenspiel von Infektion und Serum additive Auswirkungen zusammenzukommen.

Für die Freisetzung der Interleukine scheinen bestimmte Rezeptoren und die Arginin-spezifische Protease (Arg-Gingipain) eine Rolle zu spielen. So ist dieses Gingipain in der Lage, einen Protease-aktivierten Rezeptor (PAR) zu aktivieren. Zurzeit sind vier verschiedene PARs bekannt: PAR-1, -2, -3 und -4. Loubakos konnte zeigen, dass KB-Zellen auf ihrer Oberfläche die Rezeptoren PAR1-3 exprimieren. Durch eine PAR-vermittelte-Signaltransduktion des Arg-Gingipains konnte eine Ausschüttung von IL-6 und anderen Interleukinen wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  hervorgerufen werden (Loubakos et al. 2001).

Im Vergleich zu *P. gingivalis* konnte *A. actinomycetemcomitans* bei KB-Zellen eine deutlich stärkere Interleukinantwort provozieren. Die Höchstwerte lagen bei gleichzeitiger Infektion für IL-6 bei 61 pg/ml (*P. gingivalis* 28 pg/ml) und für IL-8 bei 758 pg/ml (*P. gingivalis* 258 pg/ml). Dieses Ergebnis kann durch die starke proteolytische Wirkung der Gingipaine erklärt werden. So ist bekannt, dass *P. gingivalis*, im Gegensatz zu *A. actinomycetemcomitans*, in der Lage ist, IL-6 und IL-8 zu hydrolysieren. Es wird intrazellulär weiterhin mRNA transkribiert, aber die abgesonderten Interleukine werden extrazellulär gespalten und inaktiviert (Huang et al. 2000).

Wurden die Versuche mit Patientenserum durchgeführt, zeigten sich ähnliche Ergebnisse, wobei insbesondere die ausgeschütteten IL-6-Mengen im Vergleich zum kommerziellen Serum deutlich verringert waren. Da es sich hierbei um Serum einer Infektion handelte, könnte dies auf hemmende Komponenten des Serums zurückzuführen sein.

Der Normbereich für Albumin im Serum wird mit 30-50 g/l angegeben. Die Konzentrationsverhältnisse ähneln denjenigen der Sulkusflüssigkeit, wobei durch bestehende Entzündungen im Bereich des Parodonts die

Zusammensetzung stark variieren kann (Ebersole 2003). Für unsere Versuche wurden daher Konzentrationen von 25 g/L, 50 g/L und 100 g/L verwendet.

Als wirksamer, proinflammatorischer Bestandteil des Serums konnte das Albumin identifiziert werden. Mit steigendem Albuminanteil wurde unter den nicht infizierten Zellen mehr IL-6 bei KB-Zellen sezerniert. Die infizierten Zellen zeigten schon bei mittleren Konzentrationen ihre stärkste Antwort. Bei der Ausschüttung von IL-8 konnte Albumin alleine eine sehr starke Reaktion (1,7 ng/ml bei 100 mg/ml Albumin) hervorrufen. Bei den infizierten Zellen konnte *A. actinomycetemcomitans* bei 50 mg/ml Albumin 2,1 ng/ml IL-8 aus den Zellen freisetzen. Ebenso wurden nach Infektion mit *P. gingivalis* erhöhte Spiegel an IL-8 registriert.

Welche Mechanismen im Einzelnen für die Freisetzung verantwortlich sind, ist noch unbekannt. Bei proximalen Tubulusepithelzellen der Niere (PTEC) konnte gezeigt werden, dass Albumin eine IL-8-Antwort induziert. Als Schlüssel der Signaltransduktion stellte sich der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B heraus. Dosisabhängig wurden die Untereinheiten p50 und p65 im ähnlichen Ausmaß durch Albumin aktiviert und durch Elektrophorese (EMSA) im Nucleus nachgewiesen. Weiterhin unterstützt das Vorhandensein einer Bindungsstelle in der Promoterregion von IL-8 für die NF- $\kappa$ B Proteine die entscheidende Rolle dieses Transkriptionsfaktors. Jedoch sind die Übertragungswege noch nicht vollständig geklärt, da NF- $\kappa$ B eine Anzahl von proinflammatorischen Genen kontrolliert (Tang et al. 2003).

Ein ähnlicher Wirkmechanismus konnte bei den Pigmentepithelzellen der Retina (RPEC) festgestellt werden. Bei diesen Zellen konnte Albumin, welches Glykose gebunden hatte (GHSA), eine IL-8-Stimulation durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B hervorrufen. Unter den drei bekannten Transkriptionsfaktoren AP-1, NF-IL-6, und NF- $\kappa$ B für die IL-8-Expression scheint NF- $\kappa$ B der Wichtigste zu sein. Neben IL-8 konnte GHSA mit demselben Wirkmechanismus eine Genexpression des Chemotaxins MCP-1 induzieren (Bian et al. 2001).

In einer anderen Studie konnte bei peritonealen Makrophagen eine IL-6-Stimulation durch bovines Serumalbumin (BSA) hervorgerufen werden. Hierbei zeigte sich eine halbmaximale Stimulation von IL-6 bei Zugabe von ca. 100 µg/ml BSA. Zusätzlich konnte eine Sekretion von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) beobachtet werden (Shacter et al. 1993).

### **6.3.2 Interleukinfreisetzung und freie Bakterien bei Gingivafibroblasten nach Infektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4**

#### **Freie Bakterien im Nährmedium**

Die Werte der freien Bakterien im Nährmedium verhielten sich ziemlich ausgeglichen. Bei allen Kontrollen (Mischansatz und Vorinkubation) konnten 4759 KBE von *P. gingivalis* festgestellt werden. Am meisten Keime konnten bei 2,5 % Serumzusatz ermittelt werden, wobei ein Anstieg um 39 % zu verzeichnen war. Mit steigender Serumkonzentration gingen die Zahlen wieder zurück. Ein deutlicher Anstieg konnte bei dem Patientenserum gezeigt werden. Im Vergleich zur Kontrolle stieg die Zahl der freien Bakterien um 762 % bei höchster Serumkonzentration an. Für diesen Anstieg konnte HSA nicht verantwortlich gemacht werden, da die Werte mit HSA-Zusatz eher sanken. Bei 100 mg/ml HSA wurden 13,5 % weniger freie *P.-gingivalis*-Keime festgestellt.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei *A. actinomycetemcomitans*. Über die gesamte Versuchsdauer und bei unterschiedlichem Infektionszeitpunkt wurden im Mittel 4923 KBE festgestellt (Kontrolle 3432 KBE). Wie bei *P. gingivalis* stieg die Zahl der freien Bakterien bei immunisiertem Serum um 716 % (mit 10 % Serum und 18 Stunden Versuchsdauer) an. Auch hier konnte als wirksamer Bestandteil HSA nicht identifiziert werden. Die höchste Anzahl freier *A.-actinomycetemcomitans*-Keime konnte zwar mit höchstem HSA-Zusatz festgestellt werden, jedoch fiel der Zuwachs zur Kontrollgruppe mit 2,5 % äußerst schwach aus.

## **Interleukinfreisetzung**

Die verbreitesten Zellen im parodontalen Bindegewebe stellen die Fibroblasten dar (Hassell 1993). Ihre Aufgabe ist es, Strukturproteine des Bindegewebes wie Kollagen und Elastin, aber auch Glykoproteine und Glykosaminoglykane zu synthetisieren. Sie produzieren und modifizieren die extrazelluläre Matrix und spielen eine Rolle beim Erhalt der Integrität und Homöostase des Gewebes (Hefti 1993).

Auf äußere Reize wie LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1 und bakterielle DNA reagieren sie und beginnen u. a. mit der mRNA-Expression von IL-6 und IL-8 (Agarwal et al. 1995 und Sakuta et al. 1998).

In unseren Versuchen waren die Keime *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* in der Lage, eine Freisetzung der Interleukine IL-6 und IL-8 hervorzurufen. Dabei lagen die Mengen, die *P. gingivalis* freisetzen konnte, deutlich unter denen von *A. actinomycetemcomitans*. IL-8 konnte nach der Infektion mit *P. gingivalis* noch in etwas größeren Mengen als IL-6 nachgewiesen werden. Grund hierfür könnte eine stärkere Anfälligkeit von IL-6 als IL-8 bei einer proteolytische Spaltung sein (Steffen et al. 2000).

Weiterhin scheinen die Proteasen von *P. gingivalis* bei gleichzeitiger Infektion und Serumzugabe nicht mehr in der Lage zu sein, die Interleukine effektiv zu hydrolysieren. Es kam ab einer Versuchsdauer von 6 Stunden zu einer verstärkten Freisetzung von IL-6 und IL-8, welche parallel mit höherer Serumzugabe stieg.

Bei *A. actinomycetemcomitans* zeigten sich serumabhängig eher schwache, hemmende Einflüsse auf die Interleukinausschüttung. Neben diesem hemmenden Einfluss des Serums konnte gezeigt werden, dass Teile der Oberflächen von *A. actinomycetemcomitans* eine Interleukinantwort unterdrücken. Polysaccharide der Kapsel konnten dosisabhängig die Ausschüttung der Interleukine IL-6 und IL-8 bei Fibroblasten unterdrücken (Ohguchi et al. 2003).

Die genauen Mechanismen, die zu einer Interleukinfreisetzung führen, sind noch nicht bis ins letzte Detail aufgeklärt. Durch äußere Reize scheint es zu einer Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren im Zellkern zu kommen. Neben LPS und Interleukinen konnte auch bakterielle DNA als Auslöser festgestellt werden. So konnte gezeigt werden, dass Makrophagen, NK-Zellen und B-Zellen auf bakterielle DNA reagieren (Ballas et al. 1996, Krieg et al. 1995 und Sparwasser et al. 1997). Es konnte gezeigt werden, dass DNA-Abschnitte, die von zwei *P.-gingivalis*-Stämmen (ATCC 33277 und 381) isoliert wurden, die IL-6-mRNA-Expression merklich steigern konnten. Die gesteigerte Interleukinsynthese wurde auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zurückgeführt. Als Initiator für diesen Prozess waren palindromische CpG-Motive der DNA verantwortlich (Takeshita et al. 1999).

Verschiedene LPS können in Fibroblasten eine Freisetzung von IL-6 und IL-8 in HGF hervorrufen. Imatani konnte zeigen, dass LPS von *Escherichia coli*, *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* dosisabhängig die Ausschüttung von IL-6 und IL-8 in Fibroblasten induzieren (Imatani et al. 2001). Für die Signaltransduktion ins Zellinnere werden verschiedene Rezeptoren vermutet. Der Rezeptor CD14 konnte auf Fibroblasten nachgewiesen werden (Sugawara et al. 1998). Dieser Rezeptor vermittelt durch *P.-gingivalis*-LPS die Aktivierung der Tyrosinkinase, wodurch die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 ebenfalls aktiviert werden. Der CD14-Rezeptor existiert sowohl in einer gelösten Form sCD14 im Serum, als auch in membrangebundener Form mCD14 (Watanabe et al. 1996). Eine andere Forschungsgruppe konnte bei gesunden als auch bei erkrankten HGF diesen Rezeptor über RT-PCR auf der Zelloberfläche nicht nachweisen (Kent et al. 1999). Da Fibroblasten morphologisch und funktionell sich stark unterscheiden, ist hier weitere Forschung angezeigt.

Neben dem CD14-Rezeptor wird für diese Signaltransduktion auch den Toll-Like-Rezeptoren (TLR) eine Rolle zugeschrieben. Auf der Zelloberfläche der Fibroblasten erkennen TLR-2 und TLR-4 verschiedene bakterielle



Komponenten wie Peptidoglykane, Lipoproteine (TLR-2) und LPS, Lipoteichonsäure (TLR-4). Der Signalkomplex auf der Zelloberfläche, bestehend aus dem TLR-4-Rezeptor und dem Protein MD-2, scheint für die Erkennung bestimmter LPS-Moleküle wichtig zu sein. Der Rezeptorkomplex aktiviert über ein Second-Messenger-System verschiedene Proteine einschließlich der Tyrosinkinase, was letzten Endes zur Aktivierung der Faktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 führt, die für die Transkription verschiedener Interleukine verantwortlich sind (Wang et al. 2000 a/b, Wang und Ohura 2001 und Watanabe et al. 1996).

Humane Gingiva-Fibroblasten (HGF) drücken auf ihrer Oberfläche auch den Rezeptor CD40 aus. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression dieses Rezeptors und der Sekretion von IL-6 und IL-8 bei parodontalen Entzündungen aufgezeigt werden (Dongari-Bagtzoglou et al. 1997).

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass *A. actinomycetemcomitans* auf seiner Zelloberfläche ein Peptid mit einem ungefähren Molekulargewicht von 2 kDa synthetisiert, welches dosisabhängig ebenfalls die Freisetzung von IL-6 in Fibroblasten hervorruft. Bei mononuklearen Zellen konnte dieses Peptid neben IL-6 zusätzlich noch IL-1 und TNF- $\alpha$  freisetzen (Reddi et al. 1996).

Deutlich zeigte sich bei der Ausschüttung von IL-6 ein synergistischer Effekt von Serum und Infektion, wenn sie gleichzeitig zu den Zellen zugegeben wurden. Dabei konnte bei 2,5 % Serumzusatz eine Interleukinfreisetzung von 553 pg/ml erreicht werden. Bei Vorinkubation der Zellen bzw. der Bakterien konnten im Vergleich nur 24,7 pg/ml bzw. 42 pg/ml IL-6 von *A. actinomycetemcomitans* ausgeschüttet werden.

In unseren Versuchsreihen mit immunisiertem Serum konnten wir nach 6 Stunden bei mittleren Serumkonzentrationen eine Steigerung bei der IL-6- und IL-8-Freisetzung bei beiden Keimen beobachten. Dies geht mit Ergebnissen einer Studie von Steffen einher. Sie konnte zeigen, dass mit einer

Serumkonzentration von 10 % mehr IL-6 ausgeschüttet wurde als in den Versuchen ohne Serum (Steffen et al. 2000).

Als wirksamen Serumbestandteil konnten wir auch hier Albumin nachweisen. Die nicht infizierte Kontrolle erreichte die stärkste IL-6-Antwort bei 50 mg/ml. Bei den infizierten Zellen wurde ebenfalls 50 mg/ml Albumin als effektivste Dosis für die IL-6-Synthese ausgemacht.

Bei Infektion durch *A. actinomycetemcomitans* konnte Albumin bei der IL-8-Freisetzung in großen Mengen nachgewiesen werden. Dosisabhängig stiegen die Werte von 1,06 ng/ml IL-8 (ohne HSA) auf 1,74 ng/ml bei höchster Albuminkonzentration. Die verstärkte IL-8-Freisetzung konnte bei der Infektion mit *P. gingivalis* ebenfalls gezeigt werden. Sie erreichte bei 50 mg/ml ihren Höhepunkt, wobei sie mit 820 pg/ml verglichen mit *A. actinomycetemcomitans* eher schwach ausfiel. Durch welche Vorgänge HSA bei der Signalvermittlung bei der Interleukinfreisetzung bei Fibroblasten eingreift, ist noch unbekannt und bedarf weiterer Forschung.

## 7 Schlussfolgerung

Serum, besonders von Parodontitispatienten, fördert die Vermehrung von planktonisch vorkommenden Bakterien. Protektive Bestandteile des Serums wie Antikörper oder das Komplementsystem erweisen sich somit als unwirksam. Bakterien, die mit Serum beladen sind, werden verstärkt internalisiert. Die Adhärenz wird ebenfalls durch Serum beeinflusst, jedoch sind diese Vorgänge nicht einheitlich zu bewerten. Möglicherweise verändert Serum die Expression von Rezeptoren oder interagiert mit diesen. Humanes Serumalbumin ist nicht für die Wachstumsförderung von *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 verantwortlich, jedoch blockiert es die Adhärenz und Invasion der beiden Bakterienstämme in KB-Zellen. Daraus kann eine gewisse Schutzfunktion gefolgert werden, da die Erreger für Abwehrzellen erreichbar bleiben.

Bei einer Infektion kommt es zu einer verstärkten Freisetzung von Serum und humanem Serumalbumin. Im Allgemeinen fördert Serum massiv die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8. Die durch *A. actinomycetemcomitans* induzierte Freisetzung dieser Botenstoffe wird somit zusätzlich gefördert. Ursache für diese Steigerung ist humanes Serumalbumin, durch das die Entzündungsreaktion unterstützt wird. In diesem Zusammenhang steht IL-6 bei parodontalen Erkrankungen die Aktivierung u. a. der Osteoklasten mit der Resorption des Alveolarknochens im Vordergrund. Durch den chemotaktischen Gradienten des IL-8 werden neutrophile Granulozyten angelockt, die bei Degranulation Gewebsdefekte verursachen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Serumbestandteile des Gingivafluids die Entstehung der Parodontitis fördern.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abe M, Kawamoto K, Okamoto H und Horiuchi N. 2001. Induction of collagenase-2 (Matrix metalloproteinase-8) gene expression by interleukin-1 $\beta$  in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*, 36: 153-159.
- Agarwal S. et al. 1995. Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 $\beta$ . *J Periodontal Res*, 30: 382-389.
- Albandar JM, Brunelle JA und Kingman A. 1999. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988–1994. *J Periodontol*, 70: 13-29.
- Alfano M. 1974. The origin of gingival fluid. *J Theor Biol*, 47: 127-136.
- Andrew J, Delima VD und Thomas VD. 2003. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000, 31: 55-76.
- Arimitage GC. 1999. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol*(4): 1-6.
- Asakawa R. et al. 2003. Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol*, 50(4): 1125-1139.
- Ballas ZK, Rasmussen WL und Krieg AM. 1996. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol*, 157: 1840-1845.
- Belton CM, Izutsu KT, Goodwin PC, Park Y und Lamont RJ. 1999. Fluorescence image analysis of the association between *P. gingivalis* and gingival epithelial cells. *Cell Microbiol* 1: 215-223
- Berthold P. et al. 1992. Electron immunocytochemical localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Oral Microbiol Immunol*, 7: 24-27.
- Bian ZM, Elner VM, Yoshida A, Kunkel ST und Elner SG. 2001. Signaling Pathways for Glycated Human Serum Albumin-Induced IL-8 and MCP-1 Secretion in Human RPE Cells. *IOVS*, 42(7): 1660-1668.
- Brisette C und Fives-Taylor PM. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* may utilize either actin-dependent or actin-independent mechanisms of invasion. *Oral Microbiol Immunol*, 14: 137-142.

- Brissette C und Fives-Taylor PM. 1998. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* may utilize either actin-dependent or actin-independent mechanisms of invasion. *Oral Microbiol. Immunol.*, 13: 137-142.
- Brown L und L  e H. 1993. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol* 2000(2): 57-71.
- Carlos J, Wolfe M, Zambon J und Kingman A. 1988. Periodontal disease in adolescents: some clinical and microbiological correlates of attachment loss. *J Dent Res*, 14: 12-32.
- Colotta F et al. 1993. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science*, 261: 472-475.
- Curfs J, Meis M und Hoogkamp-Korstanje A. 1997. A Primer on Cytokines: Sources, Receptors, Effects, and Inducers. *Clin Microbio Rev*, 10(4): 742-780.
- Darveau RP, Belton CM, Reife RA und Lamont RJ. 1998. Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 66: 1660-1665.
- DeCarlo AA et al. 1997. Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res*, 76: 1260-1270.
- Delima A, Oates T und Assuma R. 2001. Soluble antagonists to interleukin-1 and tumor necrosis factor inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Periodontol*, 28: 233-240.
- Dickinson DP, Kubiniec MA, Yoshimura F und Genco RJ. 1988. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. *J Bacteriol*, 170: 1658-1665.
- Dinareello CA. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87: 2095-2147.
- Dinareello CA. 1994. The biological properties of interleukin-1. *Eur. Cytokine Netw.*, 5: 517-531.
- Dongari-Bagtzoglou AI, Warren WD, Berton MT und Ebersole JL. 1997. CD40 expression by gingival fibroblasts: correlation of phenotype with function. *Int Immunol*, 9: 1233-1241.
- Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z und Xie H. 1993. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun*, 61: 2260-2265.
- Ebersole JL. 2003. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontol* 2000, 31: 135-166.

- Eick S, Rödel J, Einax JW und Pfister W. 2002. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. *Oral Microbiol Immunol*, 17: 201-208.
- Engelberg J. 1963. Cellular elements in gingival pocket fluid. *Acta Odontol Scand*, 21: 283.
- Feghali C und Wright T. 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*, 2(12-26).
- Feldman R, Bravacos J und Rose C. 1983. Association between smoking different tobacco products and periodontal indexes. *J Periodontol*, 54: 481-487.
- Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz .P und Brissette C. 1999. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000*, 20: 136-167.
- Flemming T. 1993. *Parodontologie- Ein Kompendium*. Georg Thieme. S: 5-10.
- Fletcher J et al. 1997. Interactions between periodontopathogenic bacteria and cytokines. *J Periodontal Res*, 32: 200-205.
- Fowler E, Breault L und Cuenin M. 2001. Periodontal disease and its association with systemic disease. *Mil Med*, 166(1): 85-89.
- Genco RJ. 1996a. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*(67): 1041-1049.
- Genco RJ et al. 1996b. Consensus report periodontal disease: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol*, 1: 926-932.
- Genco RJ und Löe H. 1993. The role of systemic conditions and disorders in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 2: 98-116.
- Golenhofen K. 2000. *Physiologie heute*. 2. Auflage Urban Fischer 163-164
- Grenier D et al. 2001. Role of Gingipains in Growth of *Porphyromonas gingivalis* in the Presence of Human Serum Albumin. *Infect Immun*, 69(8): 5166-5172.
- Haber J. 1994. Smoking is a major risk factor for periodontitis. *Curr Opin Periodontol*: 12-18.
- Hassel TM. 1993. Tissue and cells of the periodontium. *Periodontol 2000*, 3: 9-38.
- Hefti AF. 1993. Aspects of cell biology of the normal periodontium. *Periodontol 2000*, 3: 64-75.

- Hellwig E, Klimek J und Attin T. 1999. Ätiologie entzündlicher Parodontopathien. In: Hellwig E, Klimek J, Attin T (Hrsg.): Einführung in die Zahnerhaltung, Urban und Fischer, München, Jena. 309-321.
- Heymann D, Guicheux J, Gouin F, Passuti N. und Daculsi G. 1998. Cytokines, growth factors and osteoclastogenesis. *Cytokine*, 10: 155-168.
- Huang GT, Kim D, Lee JK, Kuramitsu, HK und Haake SK. 2000. Interleukin-8 and Intercellular Adhesion Molecule 1 Regulation in Oral Epithelial Cells by Selected Periodontal Bacteria: Multiple Effects of *Porphyromonas gingivalis* via Antagonistic Mechanisms. *Infect Immun*, 69(3): 1364-1372.
- Huang GT und Zhang X. 1999. Immunohistochemical analysis of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 in human gingival epithelium. *Int J Oral Biol*, 24: 7-16.
- Imatani T, Kato T und Okuda K. 2001. Production of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts stimulated by cell-surface preparations of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 16: 65-72.
- Ingman T, Sorsa T, Michaelis J und Konttinen YT. 1994. Immunohistochemical study of neutrophil- and fibroblast-type collagenases and stromelysin-1 in adult periodontitis. *Scand J Dent Res*, 102: 342-349.
- Izutsu KT et al. 1996. Involvement of calcium in interactions between gingival epithelial cells and *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 144: 145-150.
- Jacobs J, Roebuck K, Archibeck M, Hallab N und Glant T. 2001. Osteolysis: Basic science. *Clin Orthop*, 393: 71-77.
- Jiang Y, Mehta C, Hsu T und Alsulaimani F. 2002. Bacteria induce osteoclastogenesis via an osteoblast-independent pathway. *Infect Immun*, 70: 3143-3148.
- Jin LJ, Leung WK, Corbet EF and Söder B. 2002. Relationship of changes in interleukin-8 levels and granulocyte elastase activity in gingival crevicular fluid to subgingival periodontopathogens following non-surgical periodontal therapy in subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 29: 604-614.
- Karpinia K und Magnusson I. 2000. Recent approaches to periodontal therapy. *Expert Opin Pharmacother.*, 1(6): 1219-1226.
- Katz P et al. 1991. Epidemiology and prevention of periodontal disease in individuals with diabetes. *Diabetes Care*, 14: 375-385.

- Kent WK, Rahemtulla F und Michalek SM. 1999. Interleukin (IL)-1 and Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Stimulation of IL-6 Production by Fibroblasts Derived From Healthy or Periodontally Diseased Human Gingival Tissue. J Periodontol, 70(3): 274-282.
- Kesavalu L, Chandrasekar B und Ebersole JL. 2002. In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans. Oral Microbiol Immunol, 17: 177-180.
- Kinane D. 2001. Causation and pathogenesis of periodontal disease. Periodontol 2000, 25: 8-20.
- Kishimoto T. 1989. The biology of interleukin-6. Blood, 74: 1-10.
- Klein J. 1991. Immunologie. Erste Aufl.: Weinheim VCH Verlagsgesellschaft. 237-238.
- Kolodrubetz D. 1996. Molecular genetics and the analysis of leukotoxin in A. actinomycetemcomitans leukotoxin. J Periodontol, 67: 309-316.
- Krasse B. 1996. Serendipity or luck: stumbling on gingival crevicular fluid. J Dent Res, 75: 1627-1630.
- Krieg AM et al. 1995. CpG motifs in bacteria DNA trigger direct B-cell activation. Nature, 374: 546-549.
- Kurita-Ochiai K. 1996. Immunosuppressive factor from Actinobacillus actinomycetemcomitans down regulates cytokine production. Infect Immun, 64: 50-54.
- Lamont RJ. 2002. Host cell responses to Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans. Cambridge University Press: 299-321.
- Lamont RJ und Jenkinson HF. 1998. Life below the gum line. pathogenic mechanisms of Porphyromonas gingivalis. Microbiol Mol Biol Rev, 62: 1244-1263.
- Lamont RJ et al. 1995. Porphyromonas gingivalis Invasion of Gingival Epithelial Cells. Infect Immun, 63(10): 3878-3885.
- Lamont RJ, Hiaso GW und Gil S. 1994. Identification of a molecule of Porphyromonas gingivalis that binds to Streptococcus gordonii. Microb Pathog, 17: 355-360.
- Lamont RJ, Hersey SG und Rosan B. 1992. 1992. Characterization of the adherence of Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis to oral streptococci. Oral Microbiol Immunol, 7: 193-197.



- Lamster I. 1997. Evaluation of components of gingival crevicular fluid as diagnostic tests. *Ann Periodontol*(1): 123-137.
- Lamster I und Novak M. 1992. Host mediators in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1-2: 31-60.
- Last J. 1988. A dictionary of epidemiology. 2<sup>nd</sup> edn. New York: Oxford University Press.: 115-116.
- Li J, Ellen RP, Hoover CI und Felton JR. 1991. Association of proteases of *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis* with its adhesion to *Actinomyces viscosus*. *J Dent Res*, 70: 82-86.
- Listgarten M. 1986. Pathogenesis of Periodontitis. *J Klin Periodontal*, 13: 418-430.
- Listgarten MA, Lai C und Evian CE. 1981. Comparative antibody titers to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis, chronic periodontitis and periodontally healthy subjects. *J Clin Periodontol*(8): 155-164.
- Lourbakos A et al. 2001. Arginine-Specific Protease from *Porphyromonas gingivalis* Activates Protease-Activated Receptors on Human Oral Epithelial Cells and Induces Interleukin-6 Secretion. *Infect Immun*, 69(8): 5121-5130.
- Madianos P, Papanou P und Sandros J. 1997. *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. *Infect Immun*, 65: 3983-3990.
- Martin S, Falkler W, Suzuki J, Hawley C und Mackler B. 1986. Local and systemic immunoglobulins reactive to *Bacteroides gingivalis* in rapidly progressive and adult periodontitis. *J Periodontal Res.*, 21(4): 351-364.
- Meyer DH, Rose JE, Lippmann JE und Fives-Taylor PM. 1999. Microtubules Are Associated with Intracellular Movement and Spread of the Periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 67(12): 6518-6525.
- Meyer DH, Mintz KP und Fives-Taylor PM. 1997. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 8: 389-409.
- Meyer DH, Lippmann JE und Fives-Taylor PM. 1996. Invasion of Epithelial Cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a Dynamic, Multistep Process. *Infect Immun*, 64(8): 2988-2997.

- Miyasaki K. 1991. The neutrophil: Mechanisms of controlling periodontal bacteria. *J Periodontol*, 62: 761-774.
- Moore WEC und Moore LVH. 1994. The bacteria of periodontal disease. *Periodontol* 2000, 5: 66-67.
- Mukherjee S. 1985. The significance of crevicular fluid. *Compend Contin Educ Dent*, 6: 611-612, 614, 616.
- Njoroge T, Genco R, Sojar HT, Hamada N und Genco CA. 1997. A role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infect Immun*, 65: 1980-1984.
- Nomura T, Ishii A, Oishi Y, Kohma H und Hara K. 1998. Tissue inhibitors of metalloproteinases level and collagenase activity in gingival crevicular fluid: the relevance to periodontal diseases. *Oral Dis*, 4: 231-240.
- O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Dashper SG und Reynolds EC. 2004. Antigens of bacteria associated with periodontitis. *Periodontol* 2000, 35: 101-134.
- Offenbacher S. 1996. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*, 1: 821-878.
- Ohguchi Y et al. 2003. Capsular polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* inhibits IL-6 and IL-8 production in human gingival fibroblast. *J Periodontal Res*, 38: 190-197.
- Okada H und Murakami S. 1998. Cytokine expression in periodontal Health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9: 248-266.
- Okada N et al. 1997. Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and glucocorticoid. *J Periodontal Res*, 32: 559-569.
- Oliver R und Tervonen T. 1993. Periodontitis and tooth loss: comparing diabetics with the general population. *J Am Dent Assoc*, 124: 71-76.
- Owen CA und Campbell EJ. 1999. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol*, 65: 137-150.
- Page R. 1999. Milestones in periodontal research and remaining critical issues. *J Periodontal Res*, 34(331-339).
- Page RC et al. 1983. Rapidly progressive periodontitis. A distinct clinical condition. *J Periodontol*(54): 197-209.

- Pike R, McGraw W, Potempa J und Travis J. 1994. Lysome and argininespecific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*: Isolation and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. *J Biol Chem*, 269: 406-411.
- Pöllänen MT, Overman DO und Salonen JI. 1997. Bacterial metabolites sodium butyrate and propionate inhibit epithelial cell growth in vitro. *J Periodontal Res*, 32(326-334).
- Potempa J, Banbula A und Travis J. 2000. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol* 2000, 24: 153-192.
- Potempa J, Pike R und Travis J. 1997. Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* (gingipains) using peptidyl chloromethanes. *Biol Chem*, 378: 223-230.
- Potempa J, Pike R und Travis J. 1995. The multiple forms of trypsinlike activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infect Immun*, 63: 1176-1182.
- Preber H und Bergström J. 1990. Effect of cigarette smoking on periodontalhealing following surgical therapy. *J Klin Periodontal*, 17: 324-328.
- Reddi K et al. 1996. Surface-associated material from the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* contains a peptide which, in contrast to lipopolysaccharide, directly stimulates fibroblast interleukin-6 gene transcription. *Eur J Biochem*, 236: 871-876.
- Sakuta T et al. 1998. Dual regulatory effects of interferon-alpha, -beta, and -gamma on interleukin (IL)-8 mRNA expressed by human gingival fibroblasts in culture upon stimulation with lipopolysaccharide from *Prevotella intermedia*, interleukin-1alpha, tumor necrosis factor-alpha. *J Dent Res*, 77: 1597-1605.
- Sandros J et al. 2000. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Dent Res*, 79: 1808-1814.
- Sandros J, Papanou P und Nannmark U. 1994. *Porphyromonas gingivalis* invades human pocket epithelium in vitro. *J Periodontal Res*, 29: 62-69.
- Schreiner HC et al. 2003. Tight-adherence genes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are required for virulence in a rat model. *PNAS*, 100(12): 7295-7300.
- Schröder HE. 1991. The effects of furcation morphology on periodontal disease. *Dtsch Zahnärztl Z*, 46(5): 324-327.

- Schröder H. 1970. Quantitative parameters of early human gingival inflammation. *Arch Oral Biol*, 15: 383-400.
- Scully C. 1982. Phagocytic and killing activity of human blood, gingival crevicular, and salivary polymorphonuclear leukocytes for oral streptococci. *J Dent Res*, 61: 636-639.
- Seymour GJ und Gemmell E. 2001. Cytokines in periodontal disease: where to from here. *Acta Odontol Scand*, 59: 167-173.
- Sfakianakis A, Barr CE und Kreutzer D. 2001. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced expression of IL-1a and IL-1b in human gingival epithelial cells: role in IL-expression. *Eur J Oral Sci*, 109: 393-401.
- Sfakianakis A, Barr CE und Kreutzer D. 2001. Mechanisms of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*-induced expression of Interleukin-8 in gingival epithelial cells. *J Periodontol*, 72(10): 1413-1419.
- Shacter E, Arzadon GK und Williams JA. 1993. Stimulation of interleukin-6 and prostaglandin E2 secretion from peritoneal macrophages by polymers of albumin. *Blood*, 82(9): 2853-2864.
- Sims JE, Giri JG und Dower SK. 1994. The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clin Immunol Immunopathol*, 72: 9-14.
- Skapski H und Lehner T. 1976. A crevicular washing method for investigating immune components of crevicular fluid in man. *J Periodontal Res*, 11: 19-24.
- Smith J. 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edge sword. *J Leukoc Biol*, 56: 672-686.
- Socransky S und Haffajee A. 1994. Evidence of bacterial aetiology: a historical perspective. *Periodontol* 2000, 5: 7-25.
- Socransky S und Haffajee A. 1992. The bacterial aetiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*(63): 331-332.
- Socransky S. 1977. Microbiology of periodontal disease present status and future considerations. *J Periodontol*, 48: 497-504.
- Sparwasser T et al. 1997. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *Eur J Immunol*, 27: 1671-1679.
- Steffen M, Holt S und Ebersole JL. 2000. *Porphyromonas gingivalis* induction of mediator and cytokine secretion by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol*, 15: 172-180.

- Stocker W et al. 1995. The metzincins – topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralsins of zinc-peptidases. *Protein Sci*, 4: 823-840.
- Sugawara S, Sugiyama A, Nemoto E, Rikiishi H und Takada H. 1998. Heterogenous expression and release of CD14 human gingival fibroblasts: characterization and CD14-mediated interleukin-8 secretion in response to lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 66: 3043-3049.
- Tagikawa M, Takashiba S und Takahashi K. 1994. Prostaglandin E2 inhibits interleukin-6 release but not its transcription in human gingiva fibroblasts stimulated with interleukin-1beta or tumor necrosis faktor alpha. *J Periodontol*, 65: 1122-1127.
- Takayama A et al. 2003. Augmentation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Invasion of Human Oral Epithelial Cells and Up-Regulation of Interleukin-8 Production by Saliva CD14. *Infect Immun*, 71(10): 5598-5604.
- Takeshita A, Imai K und Hanazawa S. 1999. CpG Motifs in *Porphyromonas gingivalis* DNA Stimulate Interleukin-6 Expression in Human Gingival Fibroblasts. *Infect Immun*, 67(9): 4340-4345.
- Tang S et al. 2003. Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, 111: 515-527.
- Tonetti MS, Imboden MA und Lang NP. 1998. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *J Periodontol*, 69: 1139-1147.
- Wang PL und Ohura K. 2001. Heterogenous expression of TLR4 on human gingival fibroblasts. *J Dent Res*, 80: 990.
- Wang PL, Azuma M, Shinohara M und Ohura K, 2000a. Expression of TLR4 on human gingival fibroblasts. *J Endotoxin Res*, 6: 131.
- Wang PL, Azuma M, Shinohara M und Ohura K. 2000b. Toll-like receptor 4-mediated signal pathway of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 273: 1161-1167.
- Watanabe A, Takeshita A, Kitano S und Hanazawa S. 1996. CD14-mediated signal pathway of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Infect Immun*, 64: 4488-4494.
- Weinberg A, Belton CM, Park Y und Lamont RJ. 1997. Role of Fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* Invasion of Gingival Epithelial Cells. *Infect Immun*, 65(1): 313-316.

- Wilson M, Bronson P und Hamilton R. 1995. Immunglobulin G2 antibodies promote neutrophil killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 63(1070-1075).
- Wilson M und Genco RJ. 1989. The role of antibody, complement and neutrophils in host defence against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Immunol Invest*, 18: 187-209.
- Wilton J, Renggli H und Lehner T. 1976. The isolation and identification of mononuclear cells from the gingival crevice in man. *J Periodontal Res*, 11: 243.
- Wolff L, Dahlen G und Aepli D. 1994. Bacteria as risk markers for periodontitis. *J Periodontol*, 1: 879-925.
- Wong G und Clark S. 1988. Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network. *Immunol Today*, 9: 137-139.
- Xie H, Cai S und Lamont RJ. 1997. Environmental Regulation of Fimbrial Gene Expression in *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 65(6): 2265-2271.
- Yumoto H, Nakae H, Fujinaka K, Ebisu S und Matsuo T. 1999. Interleukin-6 (IL-6) and IL-8 are induced in human oral epithelial cells in response to exposure to periodontopathogenic *Eikenella corrodens*. *Infect Immun*, 67: 384-394.
- Zambon J. 1996. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol*, 1: 879-925.

## 9 Anhang

### Versuchsreihen mit KB-Zellen und Serum

Tabelle 5

KBE freier Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 nach Vorinkubation oder gleichzeitiger Infektion mit KB-Zellen

Vorinkubation der Zellen	1 h		6 h		18 h	
	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne Serum	70500	35700	51850	12150	46050	2600
2,5 % Serum	76650	39650	68650	13750	20600	12800
5 % Serum	87300	30800	93350	8250	2000	25650
10 %Serum	69850	33450	5010	14600	1000	12550
Vorinkubation der Bakterien	1 h		6 h		18 h	
	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne Serum	3320	96400	2950	25550	3550	3440
2,5 % Serum	3030	105950	39600	20100	6250	86050
5 % Serum	3450	92150	33550	39150	11000	65150
10 %Serum	3900	109500	78250	45300	7150	82500
Gleichzeitige Zugabe	1 h		6 h		18 h	
	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne Serum	188500	33500	93300	18650	61800	13750
2,5 % Serum	127000	33650	108000	14450	66200	19950
5 % Serum	120500	28800	112000	12100	73300	10000
10 %Serum	136500	38550	113500	10400	81100	10450

Tabelle 6

KBE adhärenter Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 nach Vorinkubation oder gleichzeitiger Infektion mit KB-Zellen

Vorinkubation der Zellen	1 h		6 h		18 h	
	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne Serum	30150	52900	92900	77900	61950	134000
2,5 % Serum	43200	51000	80800	81850	47100	138000
5 % Serum	39150	47350	77450	65800	26650	148500
10 %Serum	33650	38350	37100	48350	12600	108500
Vorinkubation der Bakterien	1 h		6 h		18 h	
	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne Serum	1150	58550	2400	130000	300	157000
2,5 % Serum	2350	59400	82000	124000	22050	205000
5 % Serum	2880	58300	136000	110000	53550	192000
10 %Serum	2900	48950	114550	122500	95300	207500
Gleichzeitige Zugabe	1 h		6 h		18 h	
	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne Serum	40250	25900	99150	38500	48100	84000
2,5% Serum	45200	21450	106000	49350	109350	106000
5% Serum	45400	20850	91350	55000	95300	93550
10%Serum	40250	22200	95450	37700	90300	75750

Tabelle 7

KBE internalisierter Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 nach Vorinkubation oder gleichzeitiger Infektion von KB-Zellen

Vorinkubation der Zellen	1 h		6 h		18 h	
	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne Serum	6250	1450	58900	8650	17650	68150
2,5 % Serum	6450	5000	57100	12900	20250	84700
5 % Serum	31750	4800	57350	21400	12250	59250
10 %Serum	32050	1850	66950	800	16950	24750
Vorinkubation der Bakterien	1 h		6 h		18 h	
	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne Serum	650	2150	3500	31800	400	55300
2,5 % Serum	1200	1400	62900	25150	17800	153000
5 % Serum	1350	1800	75450	22350	32350	167000
10%Serum	1560	700	117100	59350	52250	165500
gleichzeitige Zugabe	1 h		6 h		18 h	
	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne Serum	37700	1600	64300	24200	42350	26900
2,5 % Serum	24400	1950	75000	14800	43600	27600
5 % Serum	26600	1500	53300	11350	44700	25050
10 %Serum	7950	550	50600	1650	40350	15700



## Versuchsreihen mit KB-Zellen und Patientenserum

Tabelle 8

KBE freier und adhärenter Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 nach gleichzeitiger Zugabe von Patientenserum und Infektion von KB-Zellen

freie Bakterien	6 h		18 h	
	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne Serum	20700	15400	3500	13400
2,5 % Serum	21400	24200	18100	28900
5 % Serum	27700	49500	33000	14500
10 %Serum	26300	36400	29300	66900
adhärente Bakterien	6 h		18 h	
	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne Serum	52500	153500	27600	198100
2,5 % Serum	54400	150500	36200	207000
5 % Serum	50400	164000	51800	146000
10 %Serum	42300	148000	21300	143000

## Versuchsreihen mit KB-Zellen und HSA

Tabelle 9

KBE freier, adhärenter und internalisierter Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 nach gleichzeitiger Zugabe von HSA und Infektion von KB-Zellen

	freie Bakterien		adhärente Bakterien		internalisierte Bakterien	
	P.g.	A.a	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne HSA	19200	42000	35000	5900	7500	1430
25 mg/ml HSA	20000	32320	20000	3980	4115	1030
50 mg/ml HSA	18000	31600	4500	870	2190	450
100 mg/ml HSA	17000	13360	5390	140	1290	30

## Versuchsreihen mit Fibroblasten und Serum

Tabelle 10

KBE freier Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 nach Vorinkubation oder gleichzeitiger Infektion von Fibroblasten

Vorinkubation der Zellen	1 h		6 h		18 h	
	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne Serum	6720	3485	3390	2455	3560	2795
2,5 % Serum	7350	3860	2840	1870	1780	2205
5 % Serum	7410	3115	2675	3255	1110	3685
10 %Serum	7500	4320	2235	6050	350	3955
Vorinkubation der Bakterien	1 h		6 h		18 h	
	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne Serum	6975	3960	4810	3080	3700	6050
2,5 % Serum	7100	3560	5800	3560	15960	3230
5 % Serum	7400	3700	4475	4960	10860	3510
10 %Serum	4325	4340	4635	4360	1840	4150
Gleichzeitige Zugabe	1 h		6 h		18 h	
	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne Serum	5880	2700	3870	2250	3930	4115
2,5 % Serum	5560	3550	4390	3780	8610	17450
5 % Serum	5280	4080	4210	2080	5610	8985
10 %Serum	6040	3780	4800	5100	3700	8255

## Versuchsreihen mit Fibroblasten und Patientenserum

Tabelle 11

KBE freier Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von Patientenserum bei Fibroblasten

freie Bakterien	6 h		18 h	
	P.g.	A.a.	P.g.	A.a.
ohne Serum	6810	3200	5960	3750
2,5 % Serum	6630	3980	31700	18300
5 % Serum	8025	2700	30250	11250
10 %Serum	8120	3360	45450	26850

## Versuchsreihen mit Fibroblasten und HSA

Tabelle 12

KBE freier Keime von *P. gingivalis* 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von HSA bei Fibroblasten

freie Bakterien	6 h	
	P.g.	A.a.
ohne HSA	4050	3950
25 mg/ml HSA	4130	3890
50 mg/ml HSA	3700	4000
100 mg/ml HSA	3500	4050

## Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei KB-Zellen mit Serumzusatz

Tabelle 13

Freisetzung von IL-6 nach Vorinkubation oder gleichzeitiger Infektion bei KB-Zellen

Vorinkubation der Zellen	1 h			6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	1	0,3	1,38	1,3	-	16,4	2	-	13,4
2,5 % Serum	0,86	2	7,62	13	-	25,7	16,3	-	30,7
5 % Serum	0,2	1,7	7,12	12,8	-	21,2	11,9	-	25,3
10 %Serum	0,2	9,4	11,62	14,8	-	19,8	9,3	-	27,4
Vorinkubation der Bakterien	1 h			6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	1,4	-	1,5	0,53	-	15,12	0,65	-	3,23
2,5 % Serum	-	-	1,8	-	-	29,13	-	-	9,63
5 % Serum	-	-	2,4	-	2,1	21,4	-	-	17,62
10 %Serum	-	-	5	-	0,3	15,12	-	-	18,12
gleichzeitige Zugabe	1 h			6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	0,9	0,5	2	1,8	0,65	40,53	1,24	-	3,24
2,5 % Serum	0,9	0,7	0,7	57,9	10,4	48,63	28,8	0,9	25,6
5 % Serum	0,4	0,3	0,9	72,6	23,7	46,1	27,4	4	21,4
10 %Serum	1,7	0,7	1,7	70,4	28	61,6	30,5	9,5	17,6

Tabelle 14

Freisetzung von IL-8 nach Vorinkubation oder gleichzeitiger Infektion bei KB-Zellen

Vorinkubation der Zellen	1 h			6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	0,1	0,1	7	68	-	210	165	-	278
2,5 % Serum	130	1,3	51,3	94	-	278	361	-	365
5 % Serum	292	1,3	31,9	83	-	241	347	-	339
10 %Serum	22	3,8	108	100	-	270	378	-	387
Vorinkubation der Bakterien	1 h			6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	-	-	3,7	55,7	-	197	101	-	125,7
2,5 % Serum	-	-	3,2	-	-	308	-	0,8	212
5 % Serum	-	-	4,3	-	11,1	272	-	-	342
10 %Serum	-	0,7	8,7	-	1,1	227	-	0,2	284
gleichzeitige Zugabe	1 h			6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	5,5	0,5	6,1	142	0,7	460	337	-	502
2,5 % Serum	8,7	72	5,9	687	6,6	624	760	13	758
5 % Serum	7,8	8,9	5,3	687	94	632	822	17	743
10 %Serum	17	13,6	9,3	733	375	694	828	258	712

### Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei KB- Zellen mit Patientenserum

Tabelle 15

Freisetzung von IL-6 bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von Patientenserum bei KB-Zellen

	6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	0,1	0	0,3	0	-	0,1
2,5 % Serum	14,5	13	16,5	6,1	-	9,4
5 % Serum	16,4	7	18,5	14,8	1,5	9
10 %Serum	16,6	5,3	8	8,5	1,6	11,1

Tabelle 16

Freisetzung von IL-8 bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von Patientenserum bei KB-Zellen.

	6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	66,5	-	99,3	75	-	158
2,5 % Serum	549	238	595	674	1,1	592
5 % Serum	507	218	563	704	7,8	617
10 %Serum	718	264	585	617	92,3	682

## Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei KB-Zellen mit HSA

Tabelle 17

Freisetzung von IL-6 und bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von HSA bei KB-Zellen

	6 h		
	Kon.	P.g.	A.a.
ohne HSA	2,2	-	9,0635
25 mg/ml HSA	122,05	119,75	111,65
50 mg/ml HSA	175,8	284,85	239,8
100 mg/ml HSA	267,3	214,35	205,05

Tabelle 18

Freisetzung von IL-8 und bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von HSA bei KB-Zellen.

	6 h		
	Kon.	P.g.	A.a.
ohne HSA	157,7	-	398,9
25 mg/ml HSA	1411	1522,5	1606,4
50 mg/ml HSA	1556	1904,1	2132
100 mg/ml HSA	1756	1794,8	2081

## Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei Fibroblasten mit Serumzusatz

Tabelle 19

Freisetzung von IL-6 nach Vorinkubation oder gleichzeitiger Infektion bei Fibroblasten

Vorinkubation der Zellen	1 h			6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	-	-	-	0,1	-	1,2	0,1	-	12
2,5 % Serum	0,2	-	0,3	3,2	-	4,2	6,6	-	24,7
5 % Serum	-	-	0,1	0,7	-	2	2,8	-	9,2
10 % Serum	0,2	-	0,3	0,2	-	1	1,2	-	2
Vorinkubation der Bakterien	1 h			6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	-	0,3	-	0,5	-	0,5	3,3	-	39,4
2,5 % Serum	-	1,4	-	-	0,3	-	-	-	39,4
5 % Serum	-	2,8	-	-	0,3	-	-	-	38,1
10 % Serum	-	6	-	-	3,2	-	-	0,6	42
gleichzeitige Zugabe	1 h			6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	1,6	0,6	1,1	1,78	2,7	33,7	24,6	4,6	499
2,5 % Serum	3,4	1,5	1,8	25,8	47,1	56,8	55	60,9	553
5 % Serum	4,4	5,6	1,5	17,4	45,8	43	40,5	53,4	425
10 % Serum	6,7	4,2	2,6	19,2	64,6	14,6	31,3	71,8	290

Tabelle 20

Freisetzung von IL-8 nach Vorinkubation oder gleichzeitiger Infektion bei Fibroblasten

Vorinkubation der Zellen	1 h			6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	-	-	-	0,1	-	6,3	10	-	602
2,5 % Serum	-	-	-	0,7	-	13,7	69	-	611
5 % Serum	-	-	-	0,1	-	8,8	12	-	598
10 % Serum	-	-	-	0,1	1,1	5	11,8	-	623
Vorinkubation der Bakterien	1 h			6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	-	0,1	-	2,5	-	15,3	48,1	-	594
2,5 % Serum	-	0,4	-	-	-	12,9	-	-	339,2
5 % Serum	-	0,3	-	-	-	11,3	-	-	257,4
10 % Serum	-	0,6	-	-	0,1	7,2	-	-	371,9
gleichzeitige Zugabe	1 h			6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	-	3,8	0,1	5,8	3,65	44,5	46,2	7,21	644
2,5 % Serum	3,9	4,3	0,3	20	201	63	230	274	628
5 % Serum	10,9	5,9	0,1	16,4	219	64,5	315	215	689
10 % Serum	6,6	6	0,1	16,7	254	53,7	221	290	531

**Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei Fibroblasten mit Patientenserum**

Tabelle 21

Freisetzung von IL-6 bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von Patientenserum bei Fibroblasten

	6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	3,8	1,5	20,9	12,3	0,2	295,6
2,5 % Serum	16,7	58	246,2	20,2	65,7	316,2
5 % Serum	11,2	39,4	170	7,1	61,7	175,8
10 % Serum	8,2	12,1	47,5	3	27,3	115,3

Tabelle 22

Freisetzung von IL-8 bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von Patientenserum bei Fibroblasten

	6 h			18 h		
	Kon.	P.g.	A.a.	Kon.	P.g.	A.a.
ohne Serum	1,8	0,3	127	9,9	-	757
2,5 % Serum	9,6	221	556	73,3	236	726
5 % Serum	7,8	160	434	43,2	457	707
10 % Serum	8,5	121	271	29,6	393	635

## Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei Fibroblasten mit HSA

Tabelle 23

Freisetzung von IL-6 und bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von HSA bei Fibroblasten

	6 h		
	Kon.	P.g.	A.a.
ohne HSA	3,7	2,8	3,095
25 mg/ml HSA	62,05	50,32	41,59
50 mg/ml HSA	80,1	73,8	52,33
100 mg/ml HSA	79,45	65,3	28,15

Tabelle 24

Freisetzung von IL-8 und bei gleichzeitiger Infektion und Zugabe von HSA bei Fibroblasten

	6 h		
	Kon.	P.g.	A.a.
ohne HSA	12,4	325	1063,1
25 mg/ml HSA	172,8	678	1605,1
50 mg/ml HSA	157,4	820	1700
100 mg/ml HSA	175,3	759	1747,5

## **A Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. habil. Sigrun Eick und bei Herrn Prof. Dr. med. habil. Wolfgang Pfister für die Vergabe des Promotionsthemas und die kontinuierliche, freundliche Betreuung meiner Arbeiten.

Weiterhin danke ich dem Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Herrn Prof. Dr. med. habil. E. Straube, und seinen Mitarbeitern für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Gerätschaften sowie die Unterstützung bei den Vorbereitungen der Versuche.

Außerdem danke ich meiner Familie, besonders meiner Mutter, und meinen Freunden für den Rückhalt und die Unterstützung, die ich in den vergangenen Jahren und speziell während meines Studiums erfahren habe.



## **B      Lebenslauf**

Name:	Marcus Rönnebeck
Anschrift:	Veilchenstr. 39 76131 Karlsruhe
Geburtstag:	25.11.1975
Geburtsort:	Stuttgart
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulbildung:	1982 bis 1994 Besuch der Freien Waldorfschule 1994 bis 1997 Besuch des Technischen Gymnasiums 1. Juli 1997 Abitur
Zivildienst:	August 1997 bis September 1998
Studium:	Oktober 1997 bis Januar 2005 Studium der Zahnmedizin an der FSU Jena Januar 2005 Staatsexamen
Promotionsstudium:	Februar 2005 bis Februar 2006
Assistentszeit	Ab März 2006 bei Dr. med dent. E. Schmidt

Karlsruhe, den 31.07.2006

Marcus Rönnebeck

## **C Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: PD Dr. med. habil. Sigrun Eick und Prof. Dr. med. habil. Wolfgang Pfister,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Karlsruhe, den 31.07.2006

Marcus Rönnebeck, Verfasser